WIRKUNG MECHANISCHER FAKTOREN AUF DIE INKORPORATION VON ^{32}P-PHOSPHAT IN ADENOSINTRIPHOSPHAT BEI GLYCERINEXTRAHIERTEN INSEKTENMUSKELN

Untersuchungen über die Reversibilität der chemomechanischen Energietransformation

Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
von
Margret Ulbrich
aus Bayreuth

Bochum, Januar 1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

WIRKUNG MECHANISCHER FAKTOREN AUF DIE INKORPORATION VON ^{32}P-PHOSPHAT IN ADENOSINTRIPHOSPHAT BEI GLYCERINEXTRAHIERTEN INSEKTENMUSKELN

Untersuchungen über die Reversibilität der chemomechanischen Energietransformation

Dissertation zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

von

Margret Ulbrich

aus Bayreuth

Bochum, Januar 1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die vorliegende Arbeit wurde von 1970 bis 1973 am Institut für Zellphysiologie der Ruhr-Universität Bochum, Arbeitsgruppe Muskelphysiologie, unter Leitung von Prof. Dr. J. C. Rüegg durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. J. C. Rüegg
Korreferent: Prof. Dr. R. K. Thauer

Tag der mündlichen Prüfung: 19. März 1975

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

I. EINLEITUNG

1. Allgemeine Grundlagen der Muskelkontraktion 6
2. Untersuchungen zum Mechanismus der ATP-Spaltung
   a) Austausch-Reaktionen 14
   b) Kinetische Untersuchungen 16
   c) Neuere Untersuchungen an Fasermodellen: Resynthese von ATP auf Kosten negativer Arbeit? 19
3. Besondere Eigenschaften von Insektenflugmuskeln 21
4. Wirkungen der Glycerin-Extraktion auf Muskelfasern 23

II. METHODIK

1. Reagenzien 26
2. Herstellung der Muskelpräparate 27
3. Apparatur 28
4. Inkubationslösungen 29
5. Versuchsdurchführung 32
6. Nachweis des gebildeten ATP-(γ)-^{32}P 34
7. Berechnung der Einbau-Raten 39
8. Auswertung der mechanischen Experimente 40
9. Untersuchung der ATPase-Aktivität 41

III. ERGEBNISSE

1. Abhängigkeit der Einbau-Reaktion von der Inkubationszeit und der Zahl der Fasern 42

Seite

2. Kontrollversuche: Interferenz anderer Zellbestandteile? 45

a) Hemmung der Glycolyse durch Iodoacetat 45
b) Hemmung der Mitochondrien durch Na-Azid 45
c) Hemmung der Mitochondrien durch Oligomycin 49
d) Hemmung des Sarcoplasmatischen Reticulums durch Prenylamin 51

3. Abhängigkeit der Einbau-Reaktion von ATP, ADP und P_i 54

a) Bestimmung der optimalen ATP-Konzentration 55
b) Die Einbau-Reaktion in Gegenwart von ADP 59
c) Abhängigkeit der Einbau-Rate von der Phosphat-Konzentration; Bestimmung der Phosphat-Konzentration im Faserbündel 62

4. Abhängigkeit von Einbau-Reaktion und ATPase-Aktivität von der Ca^{2+}-Ionen-Konzentration 70

4,1. Die enzymatischen Aktivitäten unter Ca^{2+}-Mangel-Bedingungen 72

5. Die Temperaturabhängigkeit der Einbau-Reaktion 75

MECHANISCHE EXPERIMENTE

6. Dehnungsaktivierung 78

a) Spannungsreaktionen auf rasche Längenänderungen 78
b) Erhöhung von ATPase-Aktivität und Einbau-Reaktion durch Dehnung 85

7. Abhängigkeit von Einbau-Reaktion, ATPase-Aktivität und Spannung von der Amplitude rechteckförmiger Dehnungszyklen 87

8. Untersuchung der Dehnungsdauer 89

9. Abhängigkeit der Einbau-Reaktion von der Frequenz rechteckförmiger Dehnungszyklen

Seite

9,1. Wirkung hoher Frequenzen auf mechanische Phänomene 98

10. Die Frequenzabhängigkeit bei sinusförmigen Dehnungszyklen - Korrelation der Einbau-Reaktion mit Arbeit oder Leistung? 102

11. Untersuchung der statischen Dehnung 107

12. Vergleich von Dehnungs- und Entdehnungszyklen 109

13. Die mechanische Aktivierung - ein Artefakt? 111

IV. DISKUSSION

1. Wird die Incorporation von $^{32}P_i$ in ATP durch Actomyosin katalysiert? 113

2. Die Abhängigkeit der Einbau-Reaktion von mechanischen Faktoren 114

3. Bedeutung der Einbau-Reaktion für den Reaktionsmechanismus der Actomyosin-ATPase 116

4. Vergleich mit kinetischen Untersuchungen an isolierten Muskelproteinen 118

5. Energetische Betrachtungen 122

6. Sind die Reaktionen von isolierten Muskel-Proteinen und intakten Muskelfasern vergleichbar? 125

7. Koppelung zwischen chemischen und mechanischen Prozessen 127

ZUSAMMENFASSUNG 133

LITERATURVERZEICHNIS 135

Abkürzungen 149

I. EINLEITUNG

1. Allgemeine Grundlagen der Muskelkontraktion:

Die Verkürzung des Muskels beruht nach der "Sliding-Filament"-Theorie auf dem Ineinandergleiten zweier verschiedenartiger Filamente, die dabei nicht ihre Länge ändern (H. E. Huxley and Hanson, 1954; A. F. Huxley and Niedergerke, 1954). Abb. 1 zeigt schematisch die ultrastrukturelle Grundlage der Muskelkontraktion.

Der Mechanismus, der das Ineinandergleiten der Filamente bewirkt, ist nur auf molekularer Ebene zu verstehen. Die an der Kontraktion unmittelbar beteiligten Proteine sind Myosin und Actin sowie die Regulatorproteine Tropomyosin und Troponin. Myosin ist ein dimeres Fadenmolekül von hohem Molekulargewicht (ca. 500 000), an dem eine lange α-helicale "Schwanzregion" von einem globulären "Kopf" zu unterscheiden ist (Übersicht bei Perry, 1967; vgl. Abb. 2). Durch gezielte Behandlung mit Proteinasen läßt sich das Myosin-Molekül in Fragmente zerlegen: L-Meromyosin (LMM) und H-Meromyosin (HMM) entstehen nach kurzer Inkubationszeit mit Trypsin, wobei die dimere Struktur des Myosins noch erhalten bleibt. Durch Papain wird H-Meromyosin noch weiter geteilt: es werden einzelne "Köpfe" (HMM S-1) freigesetzt (Lowey et al., 1969; Margossian and Lowey, 1973; s. Abb. 2). Für enzymatische Untersuchungen sind diese Fragmente vielfach geeigneter als das intakte Myosin. Sowohl die bekannte ATPase-Aktivität als auch die Fähigkeit,

mit Actin in Wechselwirkung zu treten, sind in der Kopf-Region des Myosins lokalisiert, und zwar an zwei verschiedenen Zentren (Young, 1967; Schliselfeld and Barany, 1968; Lowey and Luck, 1969; Finlayson et al., 1969).
In elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Muskels sind die HMM-Anteile des Myosins als sog. "Querbrücken" zu sehen (H. E. Huxley, 1957).
Actin ist im Vergleich zu Myosin von einfacherer Struktur. Es besteht aus globulären Untereinheiten, die in Form von zwei umeinandergewundenen Perlenketten aggregiert sind. Eine Untereinheit, das G-Actin, hat ein Molekulargewicht von 42 000 (Elzinga et al., 1973). Actin hat keinerlei enzymatische Aktivität. Mit Actin sind die "Regulatorproteine" (Übersicht bei Ebashi and Endo, 1968) in folgender Weise assoziiert: Ein Tropomyosin - ein fadenförmiges Molekül - besetzt jeweils sieben G-Actinmoleküle des Actinfilaments und ist zusätzlich mit einem Troponin verbunden (Abb. 3). Troponin (TN) besteht seinerseits aus weiteren Untereinheiten: einer Tropomyosin-bindenden (TN-T), einer Ca^{2+}-bindenden (TN C) und einer ATPase-hemmenden (TN I) Komponente (Greaser and Gergely, 1971, 1973; Hartshorne and Mueller, 1968; Schaub and Perry, 1969, 1971).
Über die Funktionsweise der Regulatorproteine ist Folgendes bekannt: TN I hemmt in Verbindung mit Tropomyosin die ATPase-Aktivität des Actomyosins, und zwar unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Ca^{2+}-Ionen. Die Hemmung der ATPase wird jedoch aufgehoben, wenn die Ca^{2+}-bindende Komponente (TN C) anwesend ist und Ca^{2+}-Ionen bindet. Mit anderen Worten:

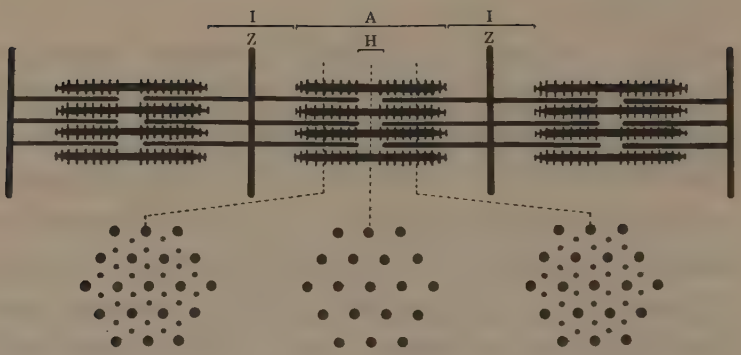


Abb. 1: Schematische Darstellung der Feinstruktur quergestreifter Muskeln: drei Sarcomere zwischen jeweils zwei Z-Scheiben (Z).
I = Isotrope Banden, enthalten die dünnen Filamente (Actin mit Regulatorproteinen).
A = Anisotrope, doppelbrechende Banden, bestehend aus sich überlappenden dünnen Filamenten und dicken Myosinfilamenten.
H = H-Zone, enthält nur Myosinfilamente.
(Aus H. E. Huxley, 1971, Proc. Roy. Soc. Lond. B 178, 131)

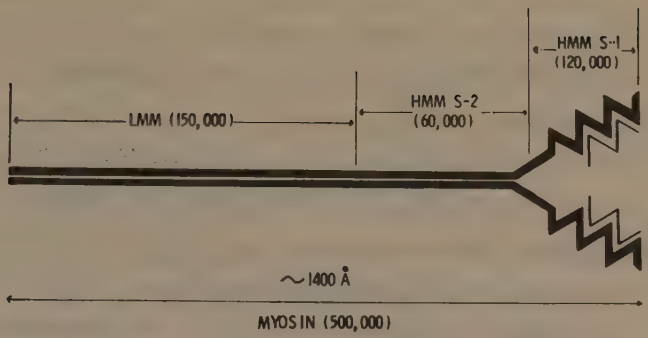


Abb. 2: Schematische Darstellung des Myosinmoleküls und seiner Unterteilung in verschiedene Fragmente, die nach Behandlung mit Proteinasen entstehen (s. Text). Die Zahlen in Klammern geben die Molekulargewichte an. (Aus: Lowey et al., J. Mol. Biol. 42, 1, 1969)

Abb. 3: Modell des dünnen Filaments (Actin mit Regulatorproteinen): Ein Tropomyosinmolekül ist mit sieben globulären Actin-Untereinheiten und einem Troponinmolekül verbunden. (Aus: Ebashi, Nature, 240, 217, 1972)

Ca^{2+}-Ionen aktivieren den Inhibitor des Inhibitors der Actomyosin-ATPase. Hierin besteht die bekannte Aktivierung der Actomyosin-ATPase durch Ca^{2+}. Gereinigtes oder "Synthetisches" Actomyosin, das völlig frei von Regulatorproteinen ist, bedarf keiner Aktivierung durch Ca^{2+}-Ionen.
Über den Wirkungsmechanismus der Regulatorproteine gaben in letzter Zeit Röntgenbeugungsanalysen einigen Aufschluß: Danach wird in Abwesenheit von Ca^{2+} die Interaktion von Actin und Myosin sterisch durch Tropomyosin behindert. In Anwesenheit von Ca^{2+} wird das Tropomyosin - vermutlich durch Konformationsänderungen der Troponine ausgelöst - in die Gruben zwischen den Actinketten geschoben, so daß der Bindungsort für Myosin freigegeben wird (Haselgrove, 1972; Parry and Squire, 1973; Head and Perry, 1974).
Wie schon gesagt hat nur das Myosin enzymatische Aktivität. Diese ist allerdings sehr gering. In Anwesenheit von Actin wird die ATPase-Aktivität jedoch bis auf den 200-fachen Wert erhöht (Eisenberg and Moos, 1968). Diese actin-aktivierte ATPase ist mit mechanischer Aktivität gekoppelt, d. h., sie bewirkt, daß die Actin- und Myosin-Filamente ineinandergleiten. Auf welche Weise die Umwandlung von chemischer Energie in mechanische Arbeit vor sich geht, ist ein zentrales Problem der Muskelforschung, das bis heute noch nicht vollständig gelöst ist. Es ist sehr wahrscheinlich, daß bei der Energie-Transformation Konformationsänderungen der beteiligten Proteine eine Rolle spielen. Hierfür gibt es strukturelle Befunde: Sowohl durch röntgenspektroskopische Analysen als auch durch

elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde festgestellt, daß es mindestens zwei verschiedene Stellungen der Querbrücken (= HMM) gibt, je nach dem Funktionszustand des Muskels. Im Rigor, wenn der Muskel infolge ATP-Mangels nicht dehnbar ist, stehen die Querbrücken in einem Winkel von 45° in Richtung auf die Sarcomerenmitte. Im erschlafften ZUstand nehmen sie dagegen eine senkrechte (90°) Stellung ein (Reedy, Holmes, Tregear, 1965). Im aktiven Zustand sind die Querbrücken offenbar in Bewegung (H. E. Huxley, Brown, Holmes, 1965).
Aufgrund dieser Befunde wurde das Modell der cyclisch tätigen Querbrücken entwickelt, dessen Anfänge auf die theoretische Arbeit von A. F. Huxley (A. F. Huxley, 1957) zurückgehen. Nach dieser Modellvorstellung heften sich die Querbrücken wiederholt an Actin an, wobei sie durch eine Art Ruderbewegung das Actin in Richtung auf die Sarcomerenmitte schieben. Dies führt zur Verkürzung des Muskels. Geht man vom erschlafften Zustand aus, so sind die Querbrücken zunächst senkrecht gestellt und vom Actin gelöst; nach Anheftung an Actin gehen sie in die 45°-Stellung über und schieben so die Filamente ineinander. Durch fortdauerndes Wiederholen dieses Zyklus können sich quergestreifte Skelettmuskeln bis auf 50 % ihrer Ruhelänge verkürzen. Abb. 4 zeigt ein einfaches Schema des Modells. Jeweils ein Querbrückenzyklus sollte mit der Spaltung eines ATP-Moleküls verbunden sein, wobei die freigesetzte Energie des ATP wahrscheinlich für Konformationsänderungen benutzt wird.
Es ist seit langem bekannt, daß ATP eine zweifache Wirkung

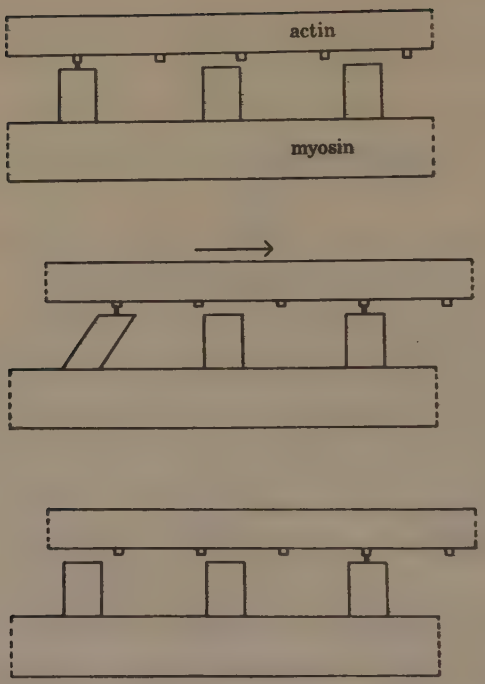


Abb. 4: Schema eines Querbrücken-Zyklus: Eine Querbrücke (oben links) geht nach Anheftung an Actin in die 45°-Stellung über. Dadurch wird das Actinfilament in Richtung auf die Sarcomerenmitte geschoben. Nach Beendigung dieser Ruderbewegung löst sich die Querbrücke ab und geht in die senkrechte Ausgangsstellung zurück, um einen neuen Zyklus zu beginnen.
Bei jedem Querbrückenzyklus wird wahrscheinlich ein ATP-Molekül gespalten.
(Aus H. E. Huxley, 1971)

auf den Muskel hat: Einmal bewirkt es Kontraktion bzw. Spannungsentwicklung, zum anderen wirkt es - in Abwesenheit von Ca^{2+}-Ionen - als Weichmacher, d. h., der Muskel wird dehnbar. (Ohne ATP ist der Muskel "totenstarr".)
Diese scheinbar gegensätzlichen Effekte lassen sich zwanglos erklären, wenn man das Eingreifen von ATP mit der zyklischen Arbeitsweise der Querbrücken in Verbindung bringt.
Es erscheint wahrscheinlich, daß ATP zunächst das Lösen der Querbrücken von Actin bewirkt und hierbei oder in einem nachfolgenden Schritt gespalten wird. Am Ende des Zyklus heftet sich die Querbrücke wieder an Actin an und geht in die 45^{o}-Stellung über; dies geschieht wahrscheinlich spontan und ohne Energieverbrauch, da auch im totenstarren Muskel diese Actomyosinverbindung vorliegt; ebenso heften sich in Lösung Myosin-S_1-Fragmente (= Myosin-Köpfe) in der 45^{o}-Stellung an Actinfilamente an (Moore, Huxley, DeRosier, 1970).
Im erschlafften und im totenstarren (Rigor) Zustand des Muskels werden offenbar Grenzzustände des Querbrückenzyklus repräsentiert.

2. Untersuchungen zum Mechanismus der ATP-Spaltung

a) Austauschreaktionen:

Eine vielfach angewandte Methode, enzymatische Reaktionen aufzuklären, ist die Untersuchung von Isotopen-Austausch-Reaktionen (Übersicht bei Boyer, 1967).
Durch den Einsatz von radioaktiv markierten Gruppen ist es möglich, Teilreaktionen unabhängig von der Netto-Reaktion zu erfassen. Der Begriff "Austausch-Reaktion" wird nicht immer eindeutig gebraucht. Von "Austausch-Reaktion" im eigentlichen Sinn sollte nur dann gesprochen werden, wenn keine vollständige Umkehr der Gesamt-Reaktion vorliegt.
Aus der Abhängigkeit einer Austausch-Reaktion von einzelnen Komponenten eines Reaktions-Systems kann auf die Art von Intermediaten geschlossen werden.

Die ersten Isotopen-Austausch-Versuche mit Actomyosin wurden 1954 von Koshland und Mitarbeitern (Koshland et al., 1954) durchgeführt, alle mit negativem Befund: es konnte weder $^{32}P_i$-ATP-, AD^{32}P-ATP- noch H_2O^{18}-ATP oder H_2O^{18}-P_i-Austausch festgestellt werden. Diese Versuche wurden allerdings unter unphysiologischen Bedingungen durchgeführt, die nur eine Aktivität der Ca^{2+}-aktivierten Myosin-ATPase zuließen (kein Mg^{2+}, 2 - 4 mM Ca^{2+}, pH 9). Bei der Wiederholung der Versuche unter verbesserten Bedingungen (Levy and Koshland, 1959) konnte aber eine H_2O^{18}-P_i-Austausch-Reaktion nachgewiesen werden: Das bei der Hydrolyse des ATP abgespaltene Phosphat enthielt mehr O^{18}-Atome als aufgrund einer einmaligen ATP-Spaltung zu erwarten gewesen wäre. Zur Deutung der Ergebnisse wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem ein Phosphoryl-Myosin als Intermediat auftritt. Dieser Mechanismus wurde

allerdings durch weitere Ergebnisse in Frage gestellt: So war die Austausch-Rate nicht nur von zweiwertigen Metall-Ionen, sondern auch von der Art des Nucleotids abhängig (Levy et al., 1960). Außerdem bestanden keine einfachen Beziehungen zwischen Austausch-Rate und Hydrolyse-Rate.
In der Folgezeit wurden die Austausch-Versuche von verschiedenen Arbeitsgruppen aufgenommen, wobei man sich überwiegend auf O^{18} als Isotop beschränkte. Die wenigen Versuche, andere Austausch-Reaktionen nachzuweisen, etwa ADP - ATP- oder P_i- ATP-Austausch, verliefen entweder negativ oder positive Befunde erwiesen sich später als Artefakte (Ulbrecht und Ulbrecht, 1957; Ulbrecht, 1962; Dempsey et al., 1963).
Dempsey und Boyer wiesen mit O^{18} noch eine andere Reaktion nach: O^{18}-Atome des freien Phosphats aus dem Medium konnten mit O-Atomen des Wassers austauschen in Gegenwart von Myosin oder Actomyosin ("medium exchange" im Gegensatz zum früher entdeckten "intermediate exchange"; Dempsey and Boyer, 1961).
Die Eigenschaften beider Austausch-Reaktionen wurden von Swanson und Yount (1966) in qualitativer und quantitativer Hinsicht verglichen. Während die beiden Reaktionen von Metall-Ionen, Enzym- und Substrat-Konzentration sowie von der Inkubationszeit in sehr verschiedener Weise abhängig waren, war die Anwesenheit eines Nucleotids für beide unbedingt notwendig, wobei es sich beim "medium exchange" auch um Mono- oder Diphosphate handeln konnte.
Da die Ergebnisse der O^{18}-Austausch-Versuche vielfach im Sinn eines phosphorylierten Myosins interpretiert wurden,

unternahm man auch Versuche, ein solches Intermediat direkt nachzuweisen. Alle Versuche, auch solche mit schonenden Methoden, die in anderen Fällen erfolgreich gewesen waren, verliefen jedoch negativ (Dempsey et al., 1963; Sartorelli et al., 1966; Imamura et al., 1965).
Zusammenfassend läßt sich über diese Untersuchungen der 50er und 60er Jahre sagen: Als einzige Austausch-Reaktion konnte bei Myosin und Actomyosin ein P_i- H_2O-Austausch gefunden werden. Weder P_i - ATP-, noch ADP - ATP- oder H_2O - ATP-Austausch war nachzuweisen.
Das Fehlen der letzten drei Austauschreaktionen sprach gegen die Reversibilität des hydrolytischen Schritts. Da andererseits auch kein phosphoryliertes Myosin, dessen Beteiligung an der P_i - H_2O-Austausch-Reaktion nach den ersten Ergebnissen vermutet worden war, nachgewiesen werden konnte, blieben die Beziehungen zwischen Austausch-Reaktion und dem Mechanismus der ATP-Spaltung letztlich ungeklärt.

b) Kinetische Untersuchungen:

Den Mechanismus der ATPase-Reaktion aufzuklären, wurde noch auf eine andere Art versucht, nämlich durch kinetische Analyse der Anfangsphase der ATP-Spaltung. Charakteristisch für die Kinetik der Actomyosin-ATPase ist das sog. "initial rapid burst"-Phänomen der P_i-Freisetzung.
A. Weber und Hasselbach stellten schon 1954 fest, daß die ATP-Spaltungsrate in den ersten Sekunden und immer dann, wenn das Enzym von neuem anfängt, ATP zu spalten, doppelt so hoch ist wie in der stationären Phase (A. Weber und

Hasselbach, 1954). Das Phänomen wurde später von Tonomura und Mitarbeitern in zahlreichen Arbeiten untersucht und interpretiert (z. B.: Kitagawa and Tonomura, 1962; Tonomura et al., 1962; Tonomura and Kanazawa, 1965; Hayashi and Tonomura, 1970). Die anfängliche schnelle P_i-Freisetzung wurde auch hier als Indiz für die Bildung eines Phosphorylmyosins angesehen. Die Begründung war, daß das labile Phosphorylmyosin infolge Abstoppens der ATPase-Reaktion mit Säure gespalten wird und zusätzliche P_i-Freisetzung ergibt. Dazu wurde angenommen, daß der Mechanismus der ATPase-Reaktion der Anfangsphase verschieden von dem des steady state sei: Zusätzlich zu "einfacher" Hydrolyse sollte ATP-Spaltung via Phosphorylierung des Myosins stattfinden. Die Interpretation der Anfangskinetik der ATPase-Reaktion wurde von Tonomura im Lauf der Zeit modifiziert und den zunehmenden Kenntnissen über das Actomyosin-System angepaßt. Beibehalten wurde jedoch das Phosphorylmyosin, obwohl gerade hierfür keine direkten Nachweise erbracht werden konnten. Die Kinetik der ATP-Spaltung durch Myosin oder Actomyosin wurde neuerdings auf andere Art erklärt: Nach Taylor erfolgt die eigentliche hydrolytische Spaltung in einem sehr schnellen Schritt. Geschwindigkeitsbestimmend ist die Dissoziation des entstandenen langlebigen Myosin-Produkt-Komplexes. Diese beiden Teilreaktionen finden am Myosin allein statt. Geht man vom Actomyosin aus, so läuft noch vor der ATP-Spaltung mit hoher Geschwindigkeit die Dissoziation des Actomyosins ab. Die Aktivierung der ATPase-Aktivität durch Actin beruht nach

Taylor auf der Erhöhung der Dissoziationsgeschwindigkeit des Myosin-Produkt-Komplexes (Taylor et al., 1970; Lymn and Taylor,1970, 1971).

c) Neuere Untersuchungen an Fasermodellen: Resynthese von ATP auf Kosten von negativer Arbeit?

Die Versuche, Incorporation von $^{32}P_i$ in ATP nachzuweisen, wurden Ende der 60er Jahre wieder aufgegriffen. Ausgangspunkt war die Frage, ob im Muskel wie in anderen energieabhängigen, ATP verbrauchenden biologischen Systemen (Ca-Pumpe des Sarcoplasmatischen Reticulums, Na-K-Pumpe) eine Umkehr der ATP-Spaltung möglich sei, die von der Zuführung von Energie in Form von negativer Arbeit abhängig wäre. Für diese Möglichkeit sprachen Ergebnisse myothermischer Untersuchungen: Danach wurde vom Muskel bei Zuführung von negativer Arbeit Energie absorbiert, d. h., es wurde weniger Wärme freigesetzt als dem Wert der zugeführten Arbeit entsprach (Hill and Howarth, 1959). Kann die Energiedifferenz für die Resynthese von ATP genutzt werden?
Für die Lösung dieser Frage müssen chemische und mechanische Leistungen gleichzeitig untersucht werden. Es kamen daher nur glycerinextrahierte Muskelfasern als Untersuchungsmaterial in Frage. In ersten Versuchen konnte Mannherz (1970) bei Insektenflugmuskeln unter Versuchsbedingungen, die negative Arbeit zuließen, tatsächlich die Bildung von ATP-(γ)-^{32}P nachweisen. Gillis und Maréchal untersuchten bei Skelettmuskelfasern von Kaninchen die Incorporation von $^{32}P_i$ in ATP in Abhängigkeit von negativer Arbeit. Eine genauere Analyse dieser Resultate sprach allerdings eher gegen die ursprünglich gemachte Annahme, daß eine Resynthese von ATP

auf Kosten zugeführter mechanischer Energie stattfindet. Wahrscheinlicher war dagegen ein Zusammenhang zwischen der gefundenen Einbau-Reaktion und der von den Muskelfasern entwickelten Spannung (Gillis und Maréchal, 1969, 1970). Das Problem der Reversibilität der ATP-Spaltung in Abhängigkeit von mechanischen Bedingungen war also nach den ersten Versuchen nicht geklärt; auch konnten Artefakte nicht ausgeschlossen werden. Es erschien uns daher notwendig, die Einbau-Reaktion von $^{32}P_i$ in ATP unter verschiedenen ionalen Bedingungen und vor allem in Abhängigkeit von mechanischen Leistungen eingehend zu untersuchen.

3. Besondere Eigenschaften von Insektenflugmuskeln

Asynchrone Insektenmuskeln wurden in einigen Insektenordnungen unabhängig voneinander entwickelt (Übersicht bei Pringle, 1967). Muskeln dieses Typs zeigen die bemerkenswerte Eigenschaft, daß die Flügelschläge bzw. die Kontraktionen der indirekten Flugmuskeln nicht synchron mit den Nervenimpulsen erfolgen, sondern mit weit höherer Frequenz. Nervenimpulse dienen offenbar nur dazu, die Muskeln mittels Ca^{2+}-Ausschüttung durch das Sarcoplasmatische Reticulum in aktionsfähigem Zustand zu halten. Das sarcoplasmatische Reticulum ist schwach entwickelt (Smith, 1961, 1966), was zunächst in Widerspruch zu der großen Aktivität dieser Muskeln steht. Die mit hoher Frequenz oszillierenden Muskeln werden aber zusätzlich zur Aktivierung durch Ca^{2+}-Ionen mechanisch durch geeignete Belastung in einem resonanten System direkt aktiviert. Wesentlich für das Funktionieren dieses Mechanismus ist es, daß die Spannungsentwicklung der Muskeln gegen die elastische Spannung des Thorax (oder entsprechender Last in vitro) derart phasenverschoben erfolgt, daß eine ständige Oszillation aufrechterhalten werden kann. Durch die direkte mechanische Aktivierung des kontraktilen Systems werden die hohen Flügelschlagfrequenzen vieler Insekten (bis zu 1000 Hz bei Mücken) ermöglicht, ohne durch die Aktivität der Ca^{2+}-Pumpe des Sarcoplasmatischen Reticulums limitiert zu werden. Daß die mechanische Aktivierbarkeit in den kontraktilen Filamenten selbst lokalisiert ist, wurde durch Experimente mit glycerin-

extrahierten Muskelfasern gezeigt (Jewell and Rüegg, 1966). Glycerinextrahierte Fasern von Insektenflugmuskeln bieten also die Möglichkeit, mechanische Leistungen unter definierten chemischen Bedingungen, unabhängig von reizleitenden, aber diffusionsbehindernden Membranen zu untersuchen.
Weitere Vorteile sind, daß die Fasern arm an Bindegewebe und leicht präparierbar sind. Elastische Phänomene sind größtenteils durch die kontraktilen Strukturen selbst bedingt. Besonders geeignet sind wegen ihrer Größe die Fasern tropischer Wasserwanzen der Gattung Lethocerus. Bei Lethocerus maximus werden die Fasern der Dorso-Longitudinalen Flugmuskeln bis zu 1,5 cm lang, bei einem Durchmesser von 70 bis 80 µ.

4. Wirkungen der Glycerin-Extraktion auf Muskelfasern

Da die Glycerinbehandlung eine wichtige Voraussetzung für die folgenden Untersuchungen ist, sollen ihre Wirkungen hier eingehender besprochen werden.

Die Extraktion von Muskelfasern in 50%iger Glycerinlösung wurde 1949 von A. Szent-Györgyi eingeführt. Der Zweck war, die Fasern permeabel zu machen, ohne die Aktomyosinstruktur zu zerstören, und so die Untersuchung mechanischer Aktivitäten unter kontrollierbaren chemischen Bedingungen zu ermöglichen (Szent-Györgyi, 1949). Glycerinextrahierte Fasern gelten seitdem als optimales System, wenn mechanische und chemische Reaktionen der kontraktilen Proteine korreliert werden sollen.

Es ist aber zu beachten, daß solche Fasern, jedenfalls in biochemischer Hinsicht, keineswegs einem vollständig isolierten Aktomyosin-System - sozusagen einem "kontraktilen Skelett" - gleichzusetzen sind; vielmehr enthalten sie noch mehr oder weniger veränderte Fragmente anderer Zellbestandteile und Restaktivitäten anderer Enzyme.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Insektenflugmuskeln (Ashhurst, 1969) zeigten, daß durch die Glycerinbehandlung vor allem die Membransysteme und Mitochondrien betroffen werden, während die Myofibrillen unverändert bleiben. Die auffälligsten Veränderungen treten innerhalb des ersten Monats der Glycerin-Extraktion ein. Besonders empfindlich reagieren die Membranen des sarcoplasmatischen Reticulums:

nach sieben Tagen sind sie völlig verschwunden. Bei Mitochondrien wird vor allem die äußere Membran zerstört, vom inneren Membransystem (Cristae) bleiben dagegen noch mehr oder weniger gut erhaltene Fragmente oder Vesikel übrig. Die Effekte der Glycerinbehandlung beruhen wohl teils auf dem osmotischen Schock, teils auf der direkten Einwirkung des Glycerins.

Im Gegensatz zu den Membranen werden die Myofibrillen - die kontraktilen Strukturen - auch über lange Zeit der Glycerin-Extraktion weder strukturell noch funktionell wesentlich verändert.

In Übereinstimmung mit den elektronenmikroskopischen Befunden konnten in glycerinextrahierten Fasern noch substratabhängige Atmung (Wilson et al., 1959; Abbott and Chaplain, 1966) sowie verschiedene mitochondriale Enzyme, wenn auch in verminderter Aktivität, nachgewiesen werden (Naylor and Merrillees, 1964). Kürzlich wurde berichtet, daß in glycerinextrahierten Insektenmuskelfasern Adenylat-Kinase und Arginin-Kinase noch über Monate in geringer Aktivität erhalten bleiben können. Der größte Teil der Enzyme wird aber schon nach einem Tag Extraktion entfernt (Abbott and Leech, 1973).

Zusammenfassend ist zu sagen, daß das mechanische Verhalten glycerinextrahierter Fasern allein durch die Actomyosinfilamente bedingt ist (Jewell and Rüegg, 1966; Abbott and Chaplain, 1966), daß aber bei enzymatischen Untersuchungen das Interferieren von Restaktivitäten anderer Zellbestandteile in Betracht zu ziehen ist und im Einzelfall durch Kontrollversuche überprüft werden muß. Die glycerinextrahierte Faser

entspricht zwar nicht in biochemischer Hinsicht, wohl aber funktionell einem "isoliertem kontraktilen Actomyosin-System".

II. METHODIK

Glycerinextrahierte Muskelfasern wurden - in $^{32}P_i$-enthaltender Aktivierungslösung inkubiert - an einer Apparatur angebracht, durch die Längenänderungen verschiedener Frequenz, Dauer und Amplitude appliziert werden konnten. Gleichzeitig konnten die mechanischen Reaktionen registriert werden. Das gebildete ATP-γ-^{32}P wurde in Gluc-6-P überführt, papierchromatographisch vom anorganischen Phosphat getrennt und quantitativ im LSC gemessen.

1. Reagenzien:

ATP (Di-Natriumsalz) wurde von den Firmen Boehringer oder Serva bezogen, ADP und Hexokinase (Kristallsuspension, aus Hefe) von Boehringer. EGTA und Oligomycin erhielten wir von Serva, Prenylamin (als 5%ige "Segontin"-Gluconat-Lsg.) von Hoechst. Die übrigen Chemikalien stammten von Merck. Trägerfreies ^{32}P-Phosphat (Orthophosphat in verdünnter HCl-Lsg.) und ATP-γ-^{32}P (als gefriergetrocknetes Ammonium-Salz) wurden von Amersham-Buchler bezogen.
Die Reagenzien waren, soweit erhältlich, von analytischem Reinheitsgrad. Das radioaktive Phosphat wurde vor Gebrauch durch Papierchromatographie (Laufmittel wie S. 35) gereinigt und anschließend eluiert.

2. Herstellung der Muskelpräparate

Alle Versuche wurden mit Dorso-Longitudinalen Muskeln von Lethocerus maximus, einer großen tropischen Wasserwanze der Familie der Belostomatidae, durchgeführt.
Die Wasserwanzen erhielten wir von Dr. Bennett vom Commonwealth Institute for Biological Control, Trinidad.

Die Muskeln wurden sofort nach der Decapitation der Tiere freipräpariert, dabei aber möglichst in der natürlichen Lage im Torax belassen. Die Extraktion erfolgte in einem Wasser-Glyceringemisch (50 : 50 vol.%), das mit 20 mM Histidin-Puffer auf pH 6,5 gepuffert war und außerdem 10 mM Na-Azid enthielt. (Einige Präparate wurden zuvor noch 2 bis 3 Min. in Diäthyläther geschüttelt, vgl. Steiger, 1969.)
Die Muskeln wurden im Anschluß an die Präparation 1/2 h im Vakuum (Exsikkator) entlüftet, um ein besseres Eindringen des Glycerins ins Tracheensystem zu ermöglichen.
Die Extraktion wurde dann 12 bis 24 h im Kühlraum (bei 4°C) unter Rühren und mehrfachem Wechsel der Extraktionslösung fortgesetzt. Anschließend konnten die Muskelpräparate im Wasser-Glyceringemisch bei -20°C mehrere Monate ohne wesentlichen Verlust der Kontraktionsfähigkeit aufbewahrt werden.
Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, für die Experimente nur Präparate zu verwenden, die wenigstens 4 Wochen extrahiert worden waren, um reproduzierbare Resultate zu erhalten.

3. Apparatur

Die Muskelfasern wurden an zwei Glasstäbchen befestigt, von denen das eine mit einem elektromagnetischen Vibrator (Goodman VP47), das andere mit einer RCA 5734 Transducer-Röhre (mechanisch elektronischer Wandler) verbunden war.
Die durch den Vibrator erzeugten Bewegungen wurden mittels Halbleiter-Feldplatten (Siemens FP 17 L 100) in einem Magnetfeld in Spannungssignale übersetzt, deren Größe von der Amplitude der Bewegungen linear abhängig war.
Die von den Muskelfasern entwickelte Kraft* wurde durch die RCA-Transducer-Röhre ebenfalls in analoge Spannungssignale umgewandelt. Beide Signale wurden auf einem Zweistrahl-Oszilloskop (Textronix 502 A) registriert.
Der mit der Transducer-Röhre verbundene Glasstab konnte mittels eines Mikromanipulators verschoben werden, um die Muskelfasern vorzudehnen.
Durch Funktionsgeneratoren konnten repetitive sinusförmige oder rechteckige Impulse variabler Frequenz und Amplitude erzeugt und nach Verstärkung (Hewlett-Packard 467 A Power Amplifier) auf den Vibrator übertragen werden.
Bei rechteckförmigen Dehnungen konnte außerdem das Verhältnis von Dehnungs- zu Entdehnungszeit variiert werden.
(Generator: Grass Sy oder H. Sachs)
Bei der Untersuchung der $^{32}P_i$-Incorporation in Abhängigkeit von mechanischen Parametern wurden überwiegend rechteckförmige Dehnungen durchgeführt. Die Anstiegszeit des Längen-

*Die von Muskeln entwickelte Kraft wird in der Physiologie üblicherweise als "Spannung" bezeichnet und in dyn angegeben.

schritts betrug 5 msec.
Außerdem wurden noch Versuche mit statischer Dehnung und mit sinusförmiger Dehnung durchgeführt. Auch bei statischen Dehnungen wurden die Längenänderungen mit dem Funktionsgenerator eingestellt. Die statische Spannung wurde mit einem Direkt-Schreiber (Schwarzer) registriert.

Funktionsprinzip und Aufbau der Apparatur wurden im Detail von Steiger beschrieben (Steiger, 1969).
Abb. 5 zeigt die Versuchsanordnung im Blockdiagramm;
Abb. 6 gibt eine detailliertere Darstellung des Inkubations-Systems mit den Muskelfasern.
Zur Inkubation der Fasern dienten ca. 0,5 ml fassende Wännchen, die hintereinander in einen Plexiglasblock eingearbeitet waren. Ein Wasserdurchflußsystem sorgte für die Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur. Die Temperatur wurde mittels eines Kryostats (Ultrakryomat TK 30 D) eingestellt. Die Temperaturschwankungen betrugen i. a. $\pm$ 0,2°C.

4. Inkubationslösungen

a) Kontraktionslösung:
15 mM ATP, 15 mM $MgCl_2$, 20 mM Imidazol/HCl-Puffer, 4 mM Ca-EGTA ($CaCl_2$ und EGTA äquimolar), 1mM Phosphat-Puffer, ^{32}P-Ortophosphat (Aktivität: 2 - 5 x 10^7 CPM/ml)
Der pH-Wert wurde auf 6,7 eingestellt.

b) Erschlaffungslösung:
enthielt anstelle von 4 mM Ca-EGTA 4mM EGTA, so daß die

Ca^{2+}-Konzentration kleiner als 10^{-8} M war (Portzehl et al., 1964).

Die Versuche wurden, wenn nicht anders angegeben, mit der o. a. Kontraktionslösung durchgeführt, der eine Ca^{2+}-Konzentration von 2×10^{-5} M entsprach.

Erschlaffungslösung wurde i. a. nur zur Vorinkubation verwendet (s. Versuchsdurchführung).

Bei Variation der ATP-Konzentration oder Zugabe von ADP wurde Mg^{2+} äquimolar zur Gesamt-Konzentration der Nucleotide eingesetzt.

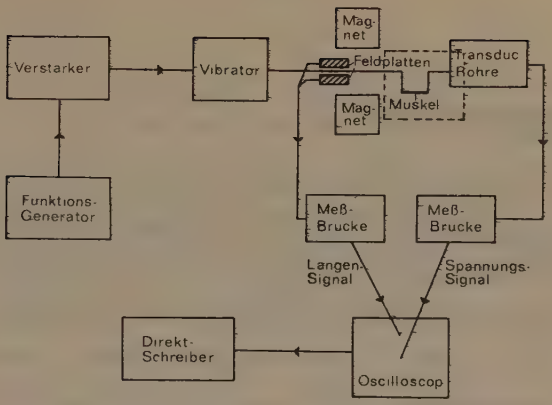


Abb. 5: Blockdiagramm der Versuchsanordnung

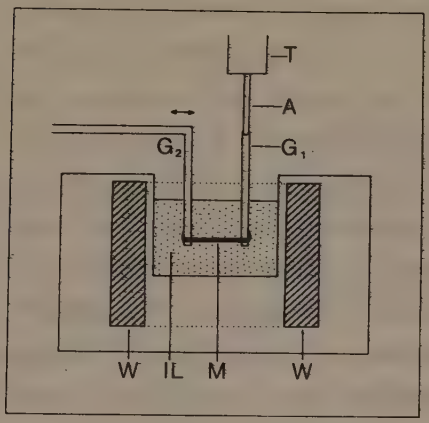


Abb. 6: Detail aus Abb. 5 (eingerahmter Teil):
A = auslenkbarer Anodenstift der Transducer-Röhre;
G_1 = mit Anodenstift fest verbundener Glasarm;
G_2 = Glasarm, der durch den Vibrator bewegt wird;
IL = Inkubationslösung; M = Muskelfasern; W = Wasserdurchflußsystem

5. Versuchsdurchführung

Vom Muskelpräparat wurde ein Bündel von wenigen Fasern unter stereomikroskopischer Kontrolle entnommen und mit den Enden an den Glasstäbchen der Apparatur mit einem schnell trocknenden Leim (Cellulose-Nitrat in Aceton gelöst) befestigt.
Das Glycerin wurde in einer Salzlösung oder in Erschlaffungslösung ausgewaschen. In frischer Erschlaffungslösung wurden die Fasern mit dem Mikromanipulator so weit vorgedehnt, daß gerade noch keine elastische Spannung auftrat. Die auf diese Weise eingestellte Ausgangslänge L_o wurde mit einem Okularmikrometer gemessen. Nach der Vorinkubation in Erschlaffungs- und Kontraktionslösung (mindestens 1/2 h) wurden die Fasern für das eigentliche Experiment in ein Bad mit 0,25 oder 0,3 ml Kontraktionslösung überführt, die ^{32}P-Orthophosphat enthielt. Nach jeweils 1 h Inkubation wurde dasselbe Faserbündel in das nächste Bad getaucht. Dies wurde bis zu 10 mal wiederholt, wobei die Versuchsbedingungen variiert wurden.
In jedem Experiment wurden nach Möglichkeit alle Parameter zweimal untersucht. Beispiel: Bei der Untersuchung verschiedener ATP-Konzentrationen wurde mit dem Faserbündel folgender Doppelversuch durchgeführt: 5 mM ⟶ 10 mM ⟶ 15 mM ⟶ 15 mM ⟶ 10 mM ⟶ 5 mM. Bei der Untersuchung mechanischer Parameter wurde außerdem zur Kontrolle des mechanischen Effekts vor und nach jedem Dehnungsversuch unter isometrischen Bedingungen ("Ruhe" = R) inkubiert. Als Beispiel sei die Untersuchung verschiedener Frequenzen angeführt:

$R_1 \longrightarrow$ 1 Hz $\longrightarrow R_2 \longrightarrow$ 10 Hz $\longrightarrow R_3 \longrightarrow$ 1 Hz $\longrightarrow R_4 \longrightarrow$ 10 $H_z \longrightarrow R_5$

Hierbei war 1 Hz die Bezugsfrequenz, die bei allen Experimenten dieser Reihe mituntersucht wurde, 10 Hz die variable Vergleichsfrequenz. (Zur Auswertung s. S. 40)
Alle Versuche wurden bei 20° C durchgeführt (außer bei der Untersuchung der Temperaturabhängigkeit).

6. Nachweis des gebildeten ATP-(γ)-^{32}P

Das γ-Phosphat des ATP wurde auf Anregung von Dr. Makinose mit Hilfe von Hexokinase auf Glucose übertragen und papierchromatographisch vom anorg. Phosphat getrennt.
Für diese Methode spricht Folgendes: Es ist wichtig, daß die organische Phosphatfraktion schneller wandert als das anorg. Phosphat. Wegen der niedrigen Einbaurate weist das ATP im Vergleich zu P_i nur eine schwache Markierung auf (etwa im Verhältnis 1 : 1000) und würde in den üblichen Trennungssystemen vom P_i überdeckt werden. Gluc-6-P kann dagegen in der gewünschten Weise von P_i getrennt werden. Dazu kommt, daß durch die Hexokinase-Reaktion eindeutig das γ-Phosphat des ATP erfaßt wird und anorganische Polyphosphate, die sich leicht aus Orthophosphat bilden und die sich chromatographisch ähnlich wie ATP verhalten, nicht stören können.
Ein Nachteil der Methode ist allerdings, daß die gleichzeitige Untersuchung der ATPase-Aktivität nicht möglich ist.

Nach Entfernen des Faserbündels bei Versuchsende wurden zu den 250 µl bzw. 300 µl der Inkubationslösung 50 µl eines Triäthanolaminpuffers (0,5 M; pH 8), der schon 0,5 M Glucose enthielt, sowie 10 µg Hexokinase zugegeben. Die Endkonzentrationen waren also: 0,07 M Glucose und 0,07 M Triäthanolaminpuffer. Mg^{2+}-Ionen waren schon vom vorausgegangenen Versuch her in ausreichender Konzentration vorhanden.

Chromatographische Trennung:
Nach einer Inkubationszeit von mindestens 1/2 h (s.u.) wurden Aliquots von jeweils 20 µl auf Chromatographie-Papier (Whatman MM 3) aufgetragen und im Solvens nach Bandurski und Axelrod (1951) bei 4° C absteigend 14 - 16 h chromatographiert. Solvens: 20 T. H_2O / 60 T. Methanol / 20 T. NH_4OH, 25 %ig; dazu 0,001 M EDTA.

Das entwickelte und getrocknete Papierchromatogramm wurde folgendermaßen ausgewertet: Den jeweiligen Aliquots entsprechende Streifen von 3 cm Breite wurden in Fraktionen von 1,5 cm Breite geschnitten. Diese wurden in K^+-arme Meßgläschen gesteckt, die 11 ml einer Szintillatorflüssigkeit enthielten (5,4 g 2,5-Diphenyloxazol und 0,1 g 2,2'-p-Phenylen-bis(4-methyl-5-phenoxazol) auf 1 L Toluol).
Die Radioaktivitäten wurden im Liquid-Szintillationszähler (Beckman LS 100) gemessen. Abb. 7 zeigt die Verteilung der Radioaktivitäten auf einem Chromatogramm.
Die Gluc-6-P-Fraktion wurde durch Farbreaktion mit m-Phenylendiammoniumdihydrochlorid identifiziert.

Zeitabhängigkeit der Hexokinase-Reaktion:
Es war zu prüfen, ob das ATP durch die Hexokinase-Reaktion vollständig umgesetzt wird und welche Inkubationszeit hierzu benötigt wird. Dazu wurde die Zeitabhängigkeit der Hexokinase-Reaktion auf zwei verschiedene Arten untersucht:

1) Durch Inkubation von Muskelfasern in Gegenwart von (^{32}P)-P_i in der üblichen Weise wurde ATP-(γ)-^{32}P gebildet, und die

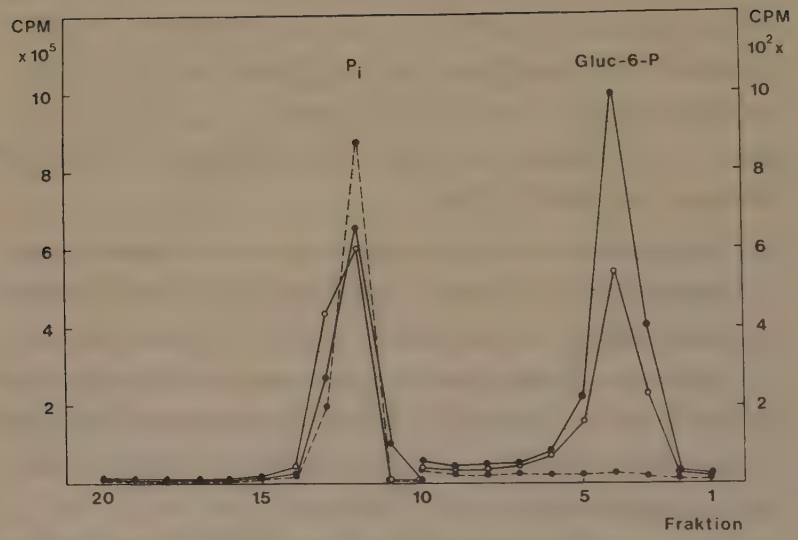


Abb. 7: Trennung von anorg. Phosphat und Gluc-6-P durch Papierchromatographie: Verteilung der Radioaktivität auf einem Chromatogramm.
Das Gluc-6-P wurde durch Hexokinase-Reaktion gebildet, im Anschluß an die Inkubation von Muskelfasern in $^{32}P_i$-markierter Kontraktionslösung.
o---o = Kontrolle ohne Fasern; die anderen beiden Kurven wurden für verschiedene Versuchsbedingungen erhalten: o——o = isometrische Kontraktion, ●——● = repetitive Dehnungszyklen.

anschließende Hexokinase-Reaktion wurde durch Entnahme von Aliquots nach verschiedenen Inkubationszeiten zeitlich verfolgt (Abb. 8a).

2) Die Hexokinase-Reaktion wurde (ohne vorhergehende Inkubation von Fasern) in Gegenwart von ATP-(γ)-^{32}P bekannter Aktivität durchgeführt und ebenfalls zeitlich verfolgt (Abb. 8b).

Beide Abbildungen zeigen etwa die gleiche Zeitabhängigkeit, d. h., nach wenigen Minuten ist die Reaktion fast vollständig abgelaufen. Nach Reaktionsende sind etwa 95 % des eingesetzten ATP in Gluc-6-P überführt (Abb. 8b).

Bei allen folgenden Versuchen wurde eine Inkubationszeit von mindestens 1/2 h eingehalten. Nach dieser Zeit ist die Reaktion mit Sicherheit vollständig abgelaufen.

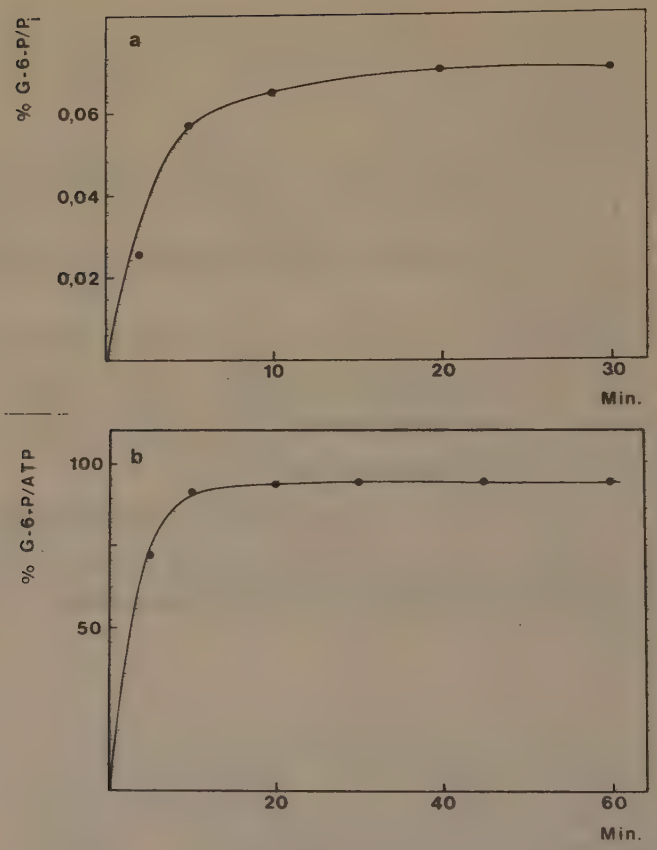


Abb. 8: Zeitabhängigkeit der Hexokinase-Reaktion; 15 mM ATP, 15 mM Mg^{2+}, 1 mM P_i, 0,07 M Glucose, 0,07 M Triäthanolaminpuffer (pH 8), Hexokinase: 40 µg/ml.
a) Hexokinase-Reaktion nach vorausgegangener Inkubation von Muskelfasern in Gegenwart von $^{32}P_i$
b) Hexokinase-Reaktion bei direktem Einsatz von ATP-(γ)-^{32}P. Weitere Erklärungen im Text.

7. Berechnung der Einbau-Raten von $^{32}P_i$ in ATP-(γ)-^{32}P

Die Einbau-Rate wurde aus dem Verhältnis der CPM-Rate der Gluc-6-P-Fraktion ($\hat{=}$ gebildetes ATP) zur CPM-Rate der P_i-Fraktion berechnet.

$$\frac{ATP}{P_i} = \frac{AT^{32}P \text{ (CPM)}}{^{32}P_i \text{ (CPM)}}$$

Da einer bestimmten Meßrate (CPM) eine bestimmte molare Phosphatkonzentration der Inkubationslösung entspricht, kann aus dem Verhältnis $AT^{32}P / {}^{32}P_i$ die eingebaute Phosphatmenge bzw. die gebildete ATP-Menge in pMol berechnet werden:

$$\text{pMol ATP} = \frac{AT^{32}P \text{ (CPM)}}{^{32}P_i \text{ (CPM)}} \times \text{pMol } P_i \times V$$

(V = Inkubationsvolumen)

Für die Berechnung der wahren Einbau-Rate ist aber nicht die spezifische Aktivität der Inkubationslösung, sondern die in den Fasern selbst entscheidend. Die zu erwartende durchschnittliche Phosphatkonzentration kann zwar aufgrund der bekannten ATPase-Aktivitäten und Diffusionskoeffizienten abgeschätzt werden oder über die Abhängigkeit der Einbau-Rate von der Phosphatkonzentration der Inkubationslösung ermittelt werden (s. S. 65). Es ist aber nicht möglich, für die einzelnen Versuche die aktuelle Phosphatkonzentration anzugeben. Die Einbau-Raten auf die spezifische Aktivität der Inkubationslösung zu beziehen, wäre jedoch irreführend.

Es ist also sinnvoller, sich auf die Angabe der prozentualen Einbau-Raten: $\frac{AT^{32}P}{^{32}P_i}$ x 100 (%) zu beschränken.
Bei den meisten Versuchen sind ohnehin die relativen Änderungen der Raten von größerem Interesse.
Um die Einbau-Reaktion quantitativ mit der ATPase-Aktivität vergleichen zu können, genügt es, von durchschnittlichen Werten der Phosphatkonzentration auszugehen.

8. Auswertung der mechanischen Experimente:

Die dehnungsinduzierte Incorporation wurde bei jedem Experiment zunächst in % des Ruhewerts (isometrische Kontraktion) berechnet (s. S. 33). Die bei den verschiedenen mechanischen Parametern erhaltenen Werte wurden dann nach Abzug der Ruhewerte als prozentuale Werte eines Bezugswerts (s. S. 33) ausgedrückt, der bei allen Experimenten einer Serie mituntersucht wurde. Diese Normalisierung war notwendig, weil sich die Versuchsreihen jeweils über mehrere Wochen oder Monate erstreckten. Dabei konnten die Muskelpräparate nicht immer die gleichen Absolutwerte erreichen, erstens wegen einer gewissen Variabilität der Muskelpräparate und zweitens wegen der Abnahme der Aktivität der Präparate nach monatelanger Lagerung.

9. Untersuchungen der ATPase-Aktivität:

Versuchsanordnung und Inkubationslösungen waren die gleichen wie bei den übrigen Versuchen (bis auf den Zusatz von $^{32}P_i$). Die Bestimmung des abgespaltenen Phosphats erfolgte nach Marsh (1959).

III. ERGEBNISSE

1. Abhängigkeit der Einbau-Reaktion von der Inkubationszeit und der Zahl der Fasern

Wird ein Muskelfaserbündel in $^{32}P_i$-enthaltender Kontrakionslösung inkubiert, so findet eine Incorporation von $^{32}P_i$ in ATP statt, wenn auch in relativ geringer Rate. Durch ein Faserbündel werden etwa 0,1 % des P_i in ATP in 1 h incorporiert. Wie Abb. 9 zeigt, steigt die Einbau-Rate mit der Dauer der Inkubationszeit zwischen 20 Min. und 4 h fast linear an. Das bedeutet, daß die Markierung von ATP auf einer enzymatischen Reaktion beruht und nicht auf Verunreinigungen zurückzuführen ist, die in den Reaktionsansatz eingeschleppt werden könnten.

Darüberhinaus ist zu folgern, daß die Reaktion unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nicht durch Substratverbrauch limitiert oder durch Anhäufung von Reaktionsprodukten gehemmt wird.

Die Einbau-Rate nimmt auch zu mit der Zahl der Fasern der inkubierten Faserbündel (Abb. 10). Bei dickeren Faserbündeln, mit mehr als sechs Fasern treten jedoch offenbar z. T. schon Diffusionsschwierigkeiten auf (Abflachen der Kurven!).

In den folgenden Versuchen wurden jeweils sechs Fasern verwendet (wenn nicht anders angegeben). Diese Zahl liegt noch im linearen Bereich, bei größtmöglicher Einbau-Rate.

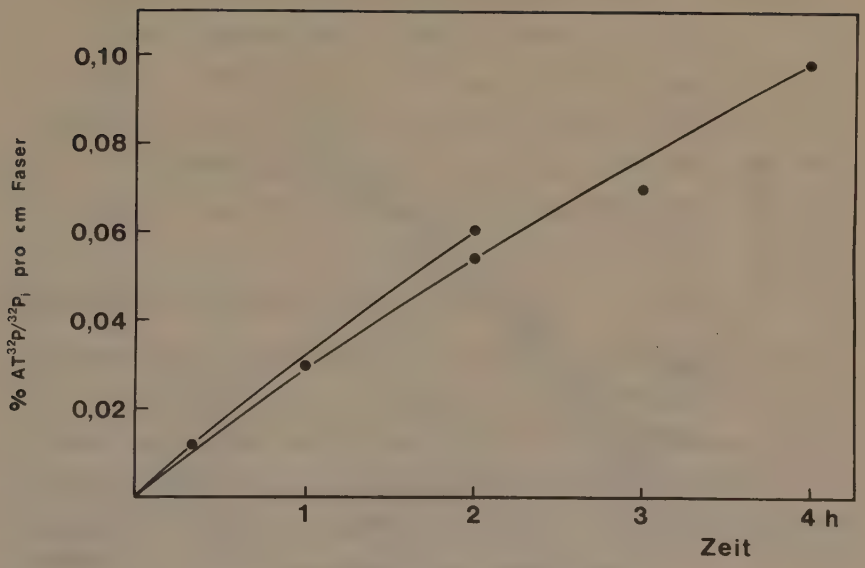


Abb. 9: Incorporation von $^{32}P_i$ in ATP-(γ)-^{32}P in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. 15 mM ATP, 15 mM Mg^{2+}, 4 mM Ca-EGTA, 10 mM Na-Azid, 20 mM Imidazol-HCl-Puffer, pH 6,7; ^{32}P als Orthophosphat (trägerfrei). Zwei Versuche mit je einem Faserbündel.

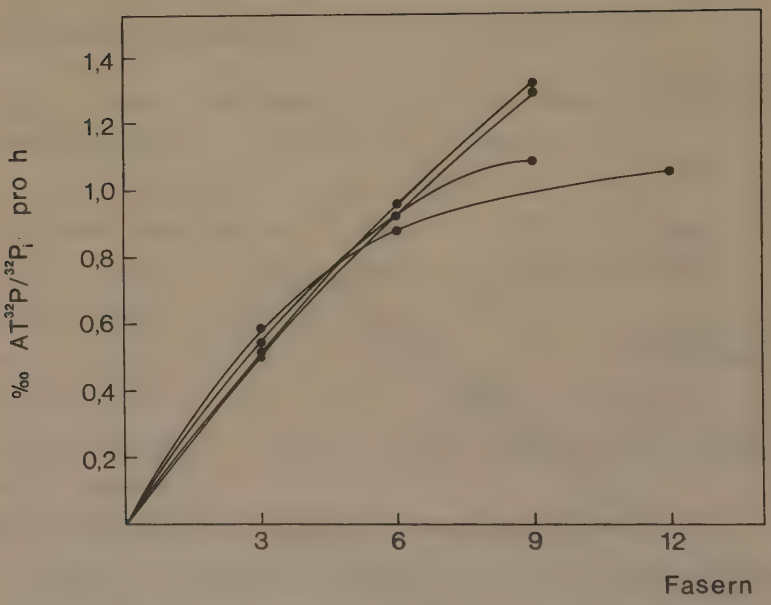


Abb. 10: Abhängigkeit der Einbau-Rate von der Zahl der Fasern der inkubierten Faserbündel (Faserlänge: 6 mm). Inkubationsbedingungen: 15 mM ATP, 15 mM $MgCl_2$, 4 mM Ca-EGTA, 1 mM (^{32}P)-P_i, 10 mM Na-Azid, 2o mM Imidazol-HCl-Puffer, pH 6,7. (Diese Bedingungen gelten auch für die folgenden Untersuchungen, soweit nicht anders angegeben.)
Jede Kurve zeigt eine Versuchsreihe mit zunehmender Zahl von Fasern des jeweiligen Präparates.

2. Kontrollversuche: Interferenz anderer Zellbestandteile?

Es war nun zu überprüfen, ob die beobachtete Incorporation von $^{32}P_i$ in ATP (auch) von anderen Zellpartikeln als den kontraktilen Proteinen katalysiert werden könnte.
Als interferierende System wären glycolytische Enzyme (relativ unwahrscheinlich), das Sarcoplasmatische Reticulum und vor allem Mitochondrien in Betracht zu ziehen, die gerade bei den asynchronen Insektenflugmuskeln in großer Zahl vorhanden sind.

a) Hemmung der Glycolyse durch Iodoacetat:

Zunächst wurde untersucht, ob an der P_i-Incorporation trotz der Glycerin-Extraktion glycolytische Enzyme beteiligt seien. Hierzu wurden die Fasern unter den üblichen Bedingungen inkubiert, nur wurde bei einigen Inkubationsbädern Iodoacetat zugesetzt. (Iodoacetat hemmt SH-Enzyme wie Alkoholdehydrogenase von Hefe und Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase.)
Wie Abb. 11 zeigt, wird die Einbau-Rate nicht durch den Zusatz von Iodoacetat (0,7 mM) herabgesetzt. Das ist nicht erstaunlich, da die glycolytischen Enzyme zum löslichen Bestand der Zelle gehören und durch die Glycerinextraktion mit größter Wahrscheinlichkeit ausgewaschen werden dürften.

b) Hemmung der Mitochondrien durch Na-Azid:

Als Inhibitor mitochondrialer ATPase-Aktivitäten hat sich bei Experimenten mit glycerinextrahierten Muskelfasern Azid bewährt, das im Gegensatz zu sonstigen bekannten Inhibitoren

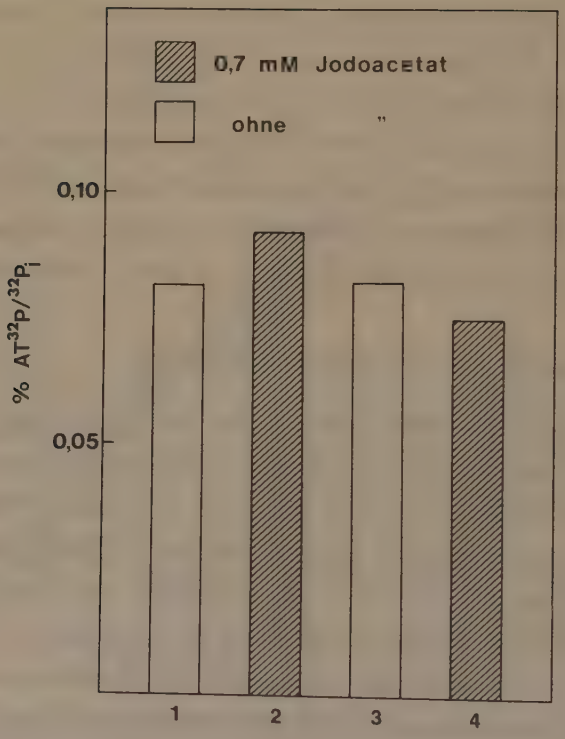


Abb. 11: Einbau-Reaktion in Gegenwart von Iodoacetat; vier aufeinanderfolgende Inkubationsperioden (1 h) eines Faserbündels, alternierend mit und ohne Iodoacetat.

der oxidativen Phosphorylierung in Wasser gelöst zugesetzt werden kann und auch in relativ hohen Konzentrationen (0,01 M) keine nachteiligen Wirkungen auf die Muskelfasern zeigt.

Azid, in erster Linie bekannt als Inhibitor der Cytochrom-oxidase, hat unabhängig davon auch ähnliche Wirkungen wie Oligomycin auf die oxidative Phosphorylierung. So hemmt Azid die DNP-stimulierte ATPase und in höheren Konzentrationen auch die Mg^{2+}-aktivierte ATPase (Novikoff et al., 1952; Robertson and Boyer, 1955; Swanson, 1956; Siekevitz et al., 1958). Auch die Hemmung gereinigter mitochondrialer ATPase konnte gezeigt werden (Vigers and Ziegler, 1968).
Neben der Hemmung des P_i-O^{18}- H_2O-Austausches und des ADP - ATP-Austausches wurde insbesondere auch die Hemmung des $^{32}P_i$ - ATP-Austausches durch Azid nachgewiesen (Robertson and Boyer, 1955; Löw et al., 1958; Bogucka and Wojtzczak, 1966). Daß Azid auch bei Insekten als Inhibitor der mitochondrialen ATPase wirkt, wurde von Sacktor (1953) und vom Brocke (1966) gezeigt.

Tab. 1 zeigt die Wirkung von Na-Azid (0,01 M) auf die Einbau-Raten von ca. 2 Wochen alten Faserpräparaten. Gegenüber den Vergleichswerten ohne Azid sind die Raten nur wenig oder gar nicht erniedrigt. Das bedeutet, daß die Mitochondrien durch die Glycerin-Extraktion weitgehend inaktiviert wurden. Trotzdem wurde sicherheitshalber bei allen Versuchen Azid zugesetzt, auch deshalb, um mikrobielle Verunreinigung der Inkubationslösungen zu verhindern.

Tab. 1: Einfluß von Na-Azid auf die Einbau-Rate von Faserbündeln nach zwei Wochen Glycerin-Extraktion. 15 mM ATP, 15 mM $MgCl^{2+}$, 4 mM Ca-EGTA, 20 mM Imidazol-Puffer, pH 6,7; $^{32}P_i$ (trägerfrei)

Einbau-Rate: % ATP/P_i pro cm Faser u. h

Expt.	0,01 M Na-Azid		----	
1	Ruhe	Dehnung*[1)]	Ruhe	Dehnung*[1)]
	0,341	0,537	0,388	0,527
	0,388	-	0,427	-
2	0,304	0,422	0,304	0,450
	-	-	0,384	-

* ⎍⎍⎍-Dehnungen, 1 Hz

[1)] Die Einbau-Rate wird mechanisch durch repetitive Dehnungszyklen erhöht (Ulbrich und Rüegg, 1971). Von diesen Effekten wird z. T. auch schon in den folgenden Untersuchungen Gebrauch gemacht, eine ins Detail gehende Behandlung dieser Effekte ist aber erst im 2. Teil der Arbeit (Mechanische Untersuchungen) möglich.

c) Hemmung der Mitochondrien durch Oligomycin:

Da Oligomycin als der klassische Inhibitor der Austausch-Reaktionen bei Mitochondrien gilt (Lardy et al., 1958), wurde untersucht, ob durch Zusatz von Oligomycin (zusätzlich zu Azid) die Einbau-Rate noch herabgesetzt werden würde. Nachteilig wirkte sich aber die Tatsache aus, daß Oligomycin in Äthanol gelöst verwendet werden muß. Äthanol hemmt die Myosin-Actin-Interaktion* und damit ATPase und Spannung (Zieger, 1969).

Eine zusätzliche Komplikation war dadurch gegeben, daß Äthanol im Lauf der Versuche verdunstete, wodurch einerseits OLigomycin ausfiel und andererseits die Spannung wieder zunahm. Abb. 12 zeigt die Wirkung von Oligomycin/Äthanol auf die Einbau-Raten und die zugehörigen Spannungswerte. Da die Einbau-Raten mit den Spannungswerten korreliert sind, sind die niedrigeren Raten in Anwesenheit von Oligomycin offensichtlich nicht auf Oligomycin selbst, sondern auf die Herabsetzung der Myosin-Actin-Interaktion zurückzuführen, die sich aus den o. a. Gründen bei den späteren Inkubationen weniger bemerkbar machte.(Wurde das Faserbündel nach Versuchsende noch einmal in das erste Bad getaucht, war die Spannung höher als bei Versuchsbeginn.)

Wie bei den Kontrollen wird auch in Anwesenheit von Oligomycin die Einbau-Rate durch mechanische Aktivierung noch erhöht (Abb. 12, D_1 und D_2).

*Diese Wirkung beruht möglicherweise darauf, daß Äthanol stärkere Bindung von Tropomyosin an Actin bewirkt und so die Bindung von Myosin an Actin blockiert (Tanaka, 1972).

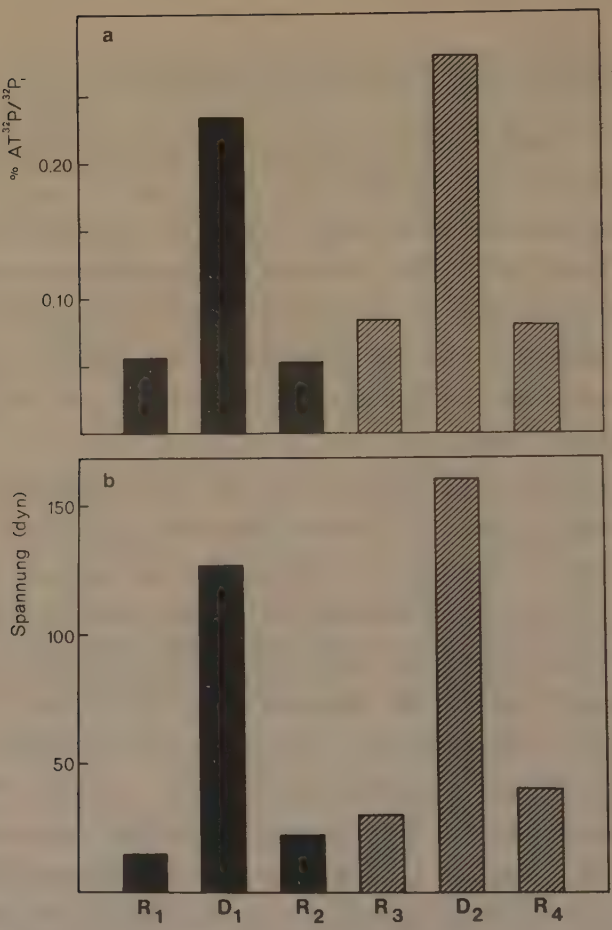


Abb. 12: Wirkung von Oligomycin/Äthanol auf Einbau-Rate (a) und Spannung (b) eines Faserbündels in sechs aufeinanderfolgenden Inkubationsperioden von je 1 h; R: isometrisch, D: ⎍⎍⎍-Dehnungen (1 Hz, 1 % L_o). schwarze Säulen: Oligomycin (330 µg/ml) schraffierte Säulen: Kontrollen mit Äthanol (6,6 %).

d) Hemmung des Sarcoplasmatischen Reticulums durch Prenylamin:

Ist möglicherweise das Sarcoplasmatische Reticulum an der Einbau-Reaktion beteiligt? Der Reaktionsmechanismus der Ca^{2+}-abhängigen ATPase des Sarcoplasmatischen Reticulums:

$$E + ATP \rightleftharpoons E \cdot ATP \rightleftharpoons E \sim P + ADP; \quad E \sim P \longrightarrow E + P_i$$

läßt nur eine ADP-ATP-Austauschreaktion zu, aber keinen ATP-P_i-Austausch (Hasselbach und Makinose, 1962, 1963; Makinose, 1966; Ulbrecht, 1962). Als interferierende Reaktion käme also nur die vollständige Resynthese von ATP durch Umkehr der Ca^{2+}-Pumpe in Frage. Diese Reaktion läuft aber nur unter geeigneten Versuchsbedingungen ab, nämlich dann, wenn die Vesikel mit Ca^{2+}-Ionen beladen werden und der Ca^{2+}-Efflux in Gegenwart von ADP und P_i mit EGTA gestartet wird (Makinose und Hasselbach, 1971).
Unsere Versuchsbedingungen waren sicher nicht optimal für diese Reaktion, doch erschien es ratsam, die Frage zu überprüfen. Als wirksamer Inhibitor der Ca^{2+}-abhängigen ATPase des Sarcoplasmatischen Reticulums hat sich Prenylamin erwiesen. Nach Makinose wird durch Prenylamin in Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-4} M auch die vom Ca^{2+}-Efflux getriebene ATP-Resynthese zu ca. 80 % gehemmt (Makinose, 1971).

Die Wirkung von Prenylamin auf die Einbau-Reaktion der Muskelfasern wurde bei zwei verschiedenen Konzentrationen ($1{,}5 \times 10^{-4}$ M und 3×10^{-4} M) untersucht. Abb. 13 zeigt zwei Beispiele von insgesamt sechs Versuchen. In der höheren

Konzentration wirkt Prenylamin offensichtlich schon schädigend auf die kontraktilen Proteine. Wie Abb. 13 b zeigt, werden durch den Zusatz von 3×10^{-4} M Prenylamin sowohl die Spannung als auch die Einbau-Rate deutlich herabgesetzt. Der Effekt nimmt mit der Dauer der Versuchszeit zu. (Das spricht für eine langsame Reaktion organisch-chemischer Natur zwischen Prenylamin und einer Gruppe der kontraktilen Proteine.)
Bei der niedrigeren Konzentration ist aber so gut wie kein Unterschied zu den Vergleichswerten ohne Prenylamin festzustellen (Abb. 13 a). Die mechanische Aktivierung tritt bei beiden Konzentrationen von Prenylamin auf.
Diese Untersuchungen sprechen gegen eine Beteiligung des Sarcoplasmatischen Reticulums an der Einbau-Reaktion. Sofern die Einbau-Rate herabgesetzt wird, ist dies auf eine allgemeine Schädigung der kontraktilen Proteine durch Prenylamin zurückzuführen, wie sie durch die Herabsetzung der Spannungsentwicklung angezeigt wird. Diese Wirkung von Prenylamin ist nicht überraschend. Auch bei einer Reihe anderer organischer Substanzen, wie Acetonen, Formamiden, Ketonen, Alkoholen wurde Hemmung der Kontraktion glycerinierter Muskelfasern beobachtet (Ebashi and Endo, 1968).

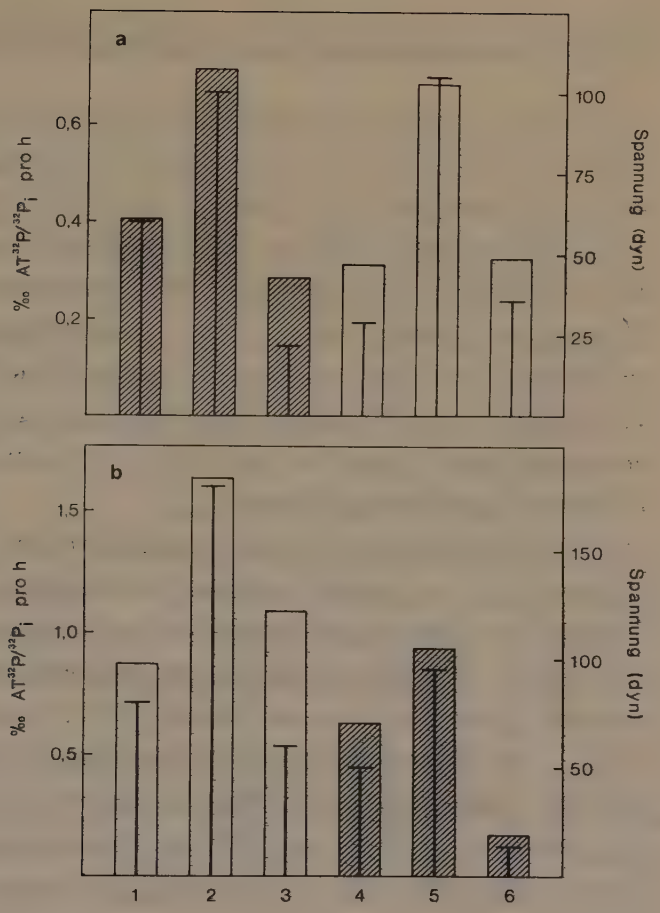


Abb. 13: Wirkung von Prenylamin auf Einbau-Rate und Spannung. Zwei Faserbündel in jeweils sechs aufeinanderfolgenden Inkubationsperioden, bei 2) und 5) mit repetitiven Dehnungen (1 Hz, 1 % L_o).
Einbau-Rate: ☐ ohne Prenylamin, ▨ mit Prenylamin, in Abb 13 a: $1{,}5 \times 10^{-4}$ M, in Abb. 13 b: 3×10^{-4} M; Spannungswerte durch senkrechte Linien ┃ dargestellt. (Zwei Beispiele von insgesamt sechs Versuchen)

3. Abhängigkeit der Einbau-Reaktion von ATP, ADP und P_i

Für optimale Versuchsbedingungen muß eine ausreichende ATP-Konzentration gewährleistet sein, da bei Faserbündeln mit Diffusionsartefakten zu rechnen ist. Weiter ist zu bedenken, daß die Einbau-Reaktion durch die infolge gleichzeitiger ATPase-Aktivität sich anhäufenden Hydrolyseprodukte ADP und P_i beeinflußt werden könnte. Je nach Versuchsbedingungen und entsprechend hoher ATPase-Aktivität werden ADP und P_i in verschiedenen Konzentrationen gebildet, was zu Änderungen der Einbau-Raten führen könnte, die dann fälschlich anderen Parametern zugeschrieben würden.

In welcher Größenordnung Konzentrationsänderungen von ATP, ADP und P_i in der Inkubationslösung zu erwarten sind, kann aufgrund der bekannten ATPase-Aktivitäten berechnet werden. Geht man von einer durchschnittlichen Spaltungsrate von 600 pMol P_i/cm Faser/min. aus (Breull, 1971; Breull et al., 1973), - das entspricht 0,108 µMol/Faserbündel/h - so ergibt sich bei einer anfänglichen Konzentration von 15 mM ATP ein Verbrauch von 2,4 % von 2,4 % des eingesetzten ATP in 1 h. Die Phosphatkonzentration wird dadurch von 1 mM auf 1,36 mM erhöht, ADP wird in der Konzentration von 0,36 mM angehäuft. Ob Konzentrationsänderungen der Inkubationslösung in dieser Größenordnung ins Gewicht fallen können, soll im Folgenden untersucht werden.

a) Bestimmung der optimalen ATP-Konzentration:

Die Feststellung der optimalen ATP-Konzentration war vor allem wichtig im Hinblick auf die vorgesehenen Versuche mit mechanischer Aktivierung. Denn es war denkbar, daß durch die wenn auch sehr geringe, mechanische Bewegung (um 0,05 mm) die durch die Diffusionsgeschwindigkeit limitierte ATP-Konzentration im Faserbündel beeinflußt werden könnte.
Die ATP-Konzentration wurde von 5 mM bis 25 mM gesteigert. Bei einigen Versuchen wurden die Fasern bei Frequenzen von 1 Hz oder 10 Hz um ca. 0,05 mm (= 1 % L_o) gedehnt.
Wie Abb. 14 zeigt, liegt die optimale ATP-Konzentration bei 15 mM. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Einbau-Rate wieder etwas ab. Eine solche Abhängigkeit von der ATP-Konzentration wurde auch für die ATPase-Aktivität glycerinextrahierter Skelettmuskelfasern festgestellt (Bendall, 1969, fig. 3.1).
Bei den Versuchen mit Dehnung sind die absoluten Raten zwar fast doppelt so hoch wie bei ungedehnten Fasern, die optimale Konzentration liegt aber im gleichen Bereich. Das bedeutet, daß die erhöhte Einbau-Rate bei gedehnten Fasern auf einer enzymatischen Aktivierung beruht und nicht etwa auf verbessertem ATP-Einstrom infolge eines "Rühreffekts". Sonst müßten sich die Kurven im Sättigungsbereich schneiden.
Abb. 15 zeigt die Einbau-Raten (Mittelwerte) in % der jeweiligen Maximalwerte bei 15 mM ATP. Es ergeben sich fast identische Kurven für Ruhe- und Dehnungsversuche, was verdeutlicht,

daß die Einbau-Raten bei ruhenden und dehnungsaktivierten Fasern in gleicher Weise von der ATP-Konzentration abhängig sind. Die festgestellte optimale Konzentration von 15 mM ATP entspricht nicht der wahren Sättigungskonzentration von Actomyosin, da die ATP-Konzentration im Faserbündel selbst infolge der ATPase-Aktivität und der begrenzten Nachdiffusion von ATP niedriger ist.

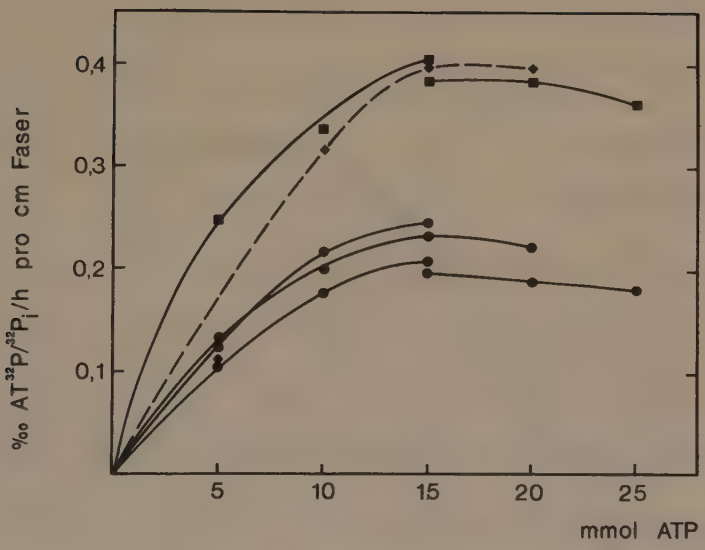


Abb. 14: Abhängigkeit der Einbau-Rate von der ATP-Konzentration.

●——● bei isometrischer Kontraktion,

■——■ bei rechteckförmigen Dehnungszyklen der Frequenz 1 Hz,

◆---◆ bei sinusförmigen Dehnungszyklen der Frequenz 10 Hz.

Jede Kurve repräsentiert einen Doppelversuch mit einem Faserbündel.

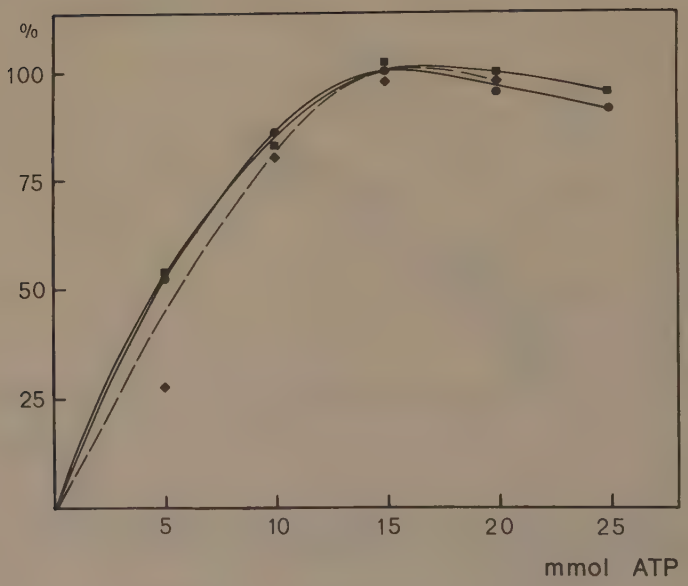


Abb. 15: Einbau-Raten (aus Abb. 14) in % der jeweiligen Maximalwerte in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration. Bezeichnungen wie in Abb. 14.

b) Die Einbau-Reaktion in Gegenwart von ADP:

Wie aufgrund der ähnlichen Struktur von ADP und ATP zu erwarten ist, wirkt ADP als kompetitiver Inhibitor der Myosin-ATPase. Die Hemmwirkung ist allerdings schwach ausgeprägt, da K_i von ADP wesentlich höher ist als K_m von ATP (Nanninga, 1962). Bei Insektenmuskeln ist Aktivierung der ATPase durch ADP beschrieben worden (Abbott und Mannherz, 1970). Diese Effekte waren allerdings sehr variabel. Sie sind wahrscheinlich z. T. dem Interferieren von Myokinase zuzuschreiben (Abbott und Leech, 1973).

Die Wirkung von ADP auf die Einbau-Reaktion wurde vor allem unter der Fragestellung untersucht, ob die Einbau-Rate durch ADP im gleichen Maß wie durch andere Parameter geändert wird. Ein solcher Befund spräche dafür, daß Änderungen der ADP-Konzentration die primäre Ursache für die Effekte anderer Parameter sein könnten.

Die ADP-Wirkung wurde bei zwei verschiedenen ATP-Konzentrationen (10 und 15 mM) untersucht. ADP wurde in Konzentrationen von 5 und 10 mM zugesetzt. (Die Mg^{2+}-Konzentration war äquimolar zur Gesamtkonzentration der Nucleotide.)

Wie Tab. 2 zeigt, wurde die Einbau-Rate nicht oder nur um wenige % durch die Zugabe von ADP geändert. Nur in einem Fall (Expt. 3) wurde eine deutlichere Herabsetzung der Einbau-Rate in Gegenwart von ADP um 20 bis 30 % festgestellt. Nach diesen Ergebnissen ist nicht zu erwarten, daß die Einbau-Raten durch Schwankungen der ADP-Konzentration infolge

verschiedener ATPase-Aktivitäten signifikant geändert werden können. Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß durch die ATPase-Aktivität allein sicher nicht so hohe ADP-Konzentrationen im Faserbündel erreicht werden wie bei den hier gezeigten Untersuchungen. Die später zu beschreibenden Effekte wie die mechanische Aktivierung sind also nicht durch Änderungen der ADP-Konzentration bedingt.

Tabelle 2:
Wirkung von ADP auf die Einbau-Rate von Faserbündeln bei zwei verschiedenen ATP-Konzentrationen.

ATP mM	ADP mM	‰ ATP/P_i/h Expt. 1	2	3	4	mittlere prozent. Raten*
10	-	0,574	0,500		0,379	
		0,565	0,509		0,429	100 %
		0,565	0,464		0,406	
10	5	0,519	0,489			
		0,545	0,493			97 %
10						
10	10	0,648	0,520		0,437	
		0,588	0,509		0,463	107 %
15	-			0,768	0,438	
				0,810	0,467	100 %
				0,629	0,475	
15	5	0,653		0,640	0,514	
		0,628		0,492	0,488	93 %
15	10			0,624	0,426	
				0,534	0,502	87 %

*Versuche ohne ADP = 100 %

c) Abhängigkeit der Einbau-Rate von der Phosphat-Konzentration, Bestimmung der Phosphat-Konzentration im Faserbündel:

Über die Konzentration von freiem Phosphat in glycerinextrahierten Faserbündeln sind keine experimentell ermittelten Werte bekannt. Bei aktiven Fasern muß die P_i-Konzentration im Faserinneren jedenfalls immer höher als die der Inkubationslösung sein, weil das kontinuierlich durch ATP-Spaltung freigesetzte Phosphat nur mit einer begrenzten Geschwindigkeit nach außen diffundieren kann.
Die Konzentrationsdifferenz ΔC ($C_{innen} - C_{außen}$) kann theoretisch mit Hilfe der Gleichung

$$\Delta C = \frac{A}{4 \pi D}$$

bestimmt werden (Meyerhof, 1930; Mannherz, 1968).
Dabei ist A die Phosphat-Freisetzung pro cm Faser und D der Diffusionskoeffizient. D wurde von Mannherz für ATP in glycerinextrahierten Insektenmuskelfasern als 2,6 bis $4{,}5 \times 10^{-7}$ cm^2 sec^{-1} bestimmt (Mannherz, 1968).
Für Phosphat dürfte D nach der Regel: $D = 7/\sqrt{MG}$ etwa doppelt so hoch sein (2,2 mal).
Im ungünstigsten Fall ergibt sich daraus:

$D_{Phosphat} = 5{,}5 \times 10^{-7}$ cm^2 sec^{-1}

Setzt man für A: 600 pMol/ cm Faser/Min. (= 10×10^{-6} µMol/ cm Faser/sec) ein, so ergibt sich nach der o. a. Gleichung

$\Delta C = 1{,}45$ µMol/ml = 1,45 mM

Wird der Inkubationslösung kaltes Phosphat in steigenden Konzentrationen zugegeben, so nimmt die Einbau-Rate nicht in dem Maß ab, wie es der Verdünnung der spezifischen Aktivität entspräche (Abb. 16). Bei Konzentrationen von 1 bis 2 mM P_i ist die Rate nicht sehr viel kleiner als bei trägerfrei zugesetztem $^{32}P_i$. Das bedeutet, daß im Faserbündel von vornherein Phosphat in größerer Konzentration vorhanden ist, wie es auch aus den o. a. Gründen zu erwarten ist. Unter der angenommenen Voraussetzung, daß Phosphat keine sekundären Effekte auf die Einbau-Reaktion hat*, kann aus der Abnahme der Einbau-Rate in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration der Inkubationslösung die Verdünnung der spezifischen Aktivität im Faserbündel und damit die Ausgangskonzentration von Phosphat im Faserbündel (= ΔC) errechnet werden.

Für die Berechnung des Verdünnungsfaktors der spezifischen Aktivität (im Faserbündel) und der Konzentrationsdifferenz ($C_{Fasern} - C_{Lösung}$) wurden folgende Parameter verwendet:

I = Einbau-Rate für erhöhte P_i-Konzentration der Inkubations-Lösung (Zusatz von kaltem Phosphat)

I_o = Einbau-Rate für trägerfreies $^{32}P_i$

C_1 = P_i-Konzentration der Inkubationslösung

ΔC = Konzentrationsdifferenz ($C_{Faser} - C_{Lösung}$)

---

* Phosphat ändert nicht die ATPase-Aktivität von glycerin-extrahierten Fasern, obwohl es die Spannung herabsetzt (Rüegg et al., 1971).

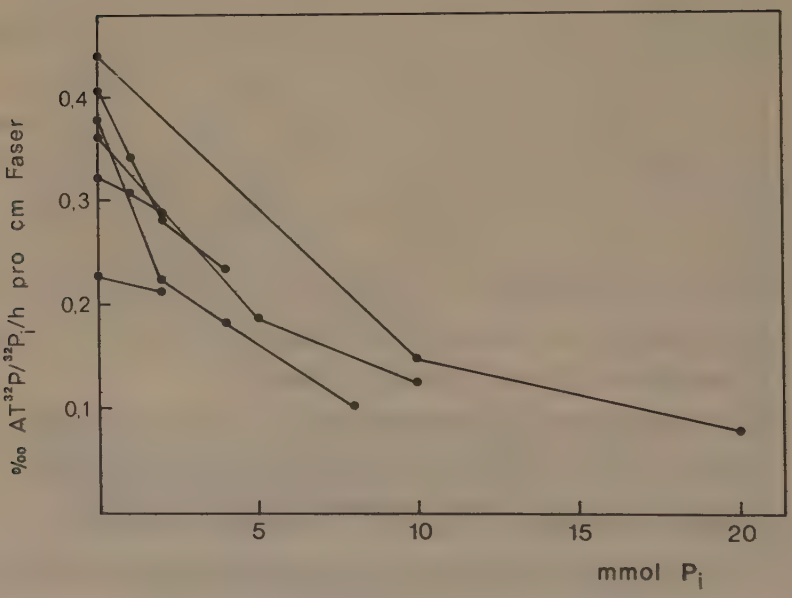


Abb. 16: Abnahme der Einbau-Rate bei Erhöhung der Phosphat-Konzentration der Inkubationslösung.
Jede Kurve repräsentiert einen Doppelversuch mit einem Faserbündel (7 - 8 Fasern).

Der Quotient I_o/I sollte dem Faktor entsprechen, um den bei der gesuchten Konzentrationsdifferenz (ΔC) durch eine bestimmte P_i-Konzentration der Inkubationslösung die spezifische Aktivität im Faserbündel erniedrigt wird bzw. die P_i-Konzentration erhöht wird.

Also: $I_o/I = \frac{\Delta C + C_1}{\Delta C}$

Die Werte I_o/I gegen die P_i-Konzentration der Inkubationslösung aufgetragen ergeben eine Gerade, aus deren Steigung sich der Faktor ermitteln läßt (Abb. 17).

Es wurde gefunden: $I_o/I = 0{,}18\ C_1 + 1$

Bei einer Konzentration von 1 mM P_i in der Inkubationslösung wird also die P_i-Konzentration im Faserbündel um den Faktor 1,18 erhöht, bei 2 mM um den Faktor 1,36 usw..

Aus der Beziehung $\frac{\Delta C + 1}{\Delta C} = 1{,}18$ ergibt sich:

$\Delta C = 5{,}5$ (mM)

Um zu überprüfen, ob die relative Einbau-Rate I/I_o tatsächlich der einfachen Funktion: $I/I_o = 1 / 0{,}18\ C_1 + 1$ folgt, wurden mit den nach dieser Formel berechneten Einbau-Raten die experimentell gefundenen Werte verglichen. Wie Abb. 18 zeigt, stimmen die experimentellen Werte mit den berechneten gut überein.

Es hat sich somit gezeigt, daß die Abhängigkeit der Einbau-Rate von der Phosphat-Konzentration eine einfache Funktion der Abnahme der spezifischen Aktivität im Faserbündel ist, wobei

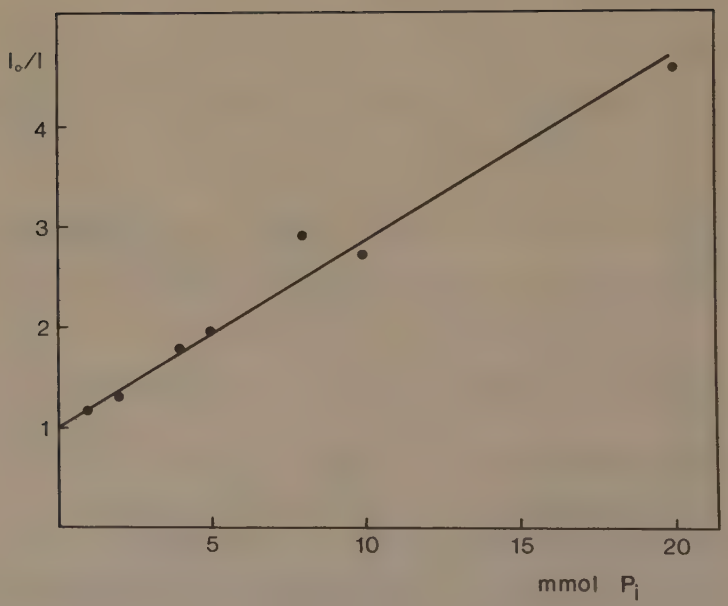


Abb. 17: Verhältnis I_o/I der Einbau-Raten als Funktion der Phosphat-Konzentration der Inkubationslösung. I_o = maximale Einbau-Rate, ohne Zusatz von kaltem Phosphat; I = Einbau-Raten für variable Phosphat-Konzentration der Inkubationslösung (Zusatz von kaltem Phosphat); Die Kurve repräsentiert die Mittelwerte, die aus den in Abb. 16 dargestellten Einzelversuchen berechnet wurden.

von einer Konzentrationsdifferenz von 5 mM Phosphat ausgegangen werden muß. Die zu Beginn angenommene Voraussetzung, daß Phosphat keine weiteren Effekte auf die Einbau-Reakion hat, ist offenbar erfüllt, wenigstens für Konzentrationen über 5,5 mM. Wäre dies nicht der Fall, sollte man einen gekrümmten Kurvenverlauf für I_o/I als Funktion der Phosphat-Konzentration erwarten (Abb. 17).

Da Phosphat das Substrat für die Einbau-Reaktion ist, ist in einem bestimmten Bereich eine Konzentrationsabhängigkeit zu erwarten. Dieser Bereich kann offenbar in unseren Versuchen nicht erfaßt werden, da die Phosphat-Konzentration im Faserbündel von vornherein schon im millimolaren Bereich liegt, der zur Substratsättigung sicher ausreicht.
Bei Actomyosin in Lösung wurde allerdings eine Aktivierung der Einbau-Reaktion durch 10^{-4} M Phosphat festgestellt (Hotta and Fujita, 1971).

Der Wert von 5,5 mM für die Konzentrationsdifferenz des Phosphats ist hoch im Vergleich zu dem nach der Diffusionsgleichung berechneten Wert von 1,45 mM (s. S. 62).
Bei dem theoretisch bestimmten Wert ist natürlich von vornherein mit größerer Unsicherheit zu rechnen.(Übertragung physikalischer Gesetzmäßigkeiten auf komplexe biologische Systeme!)
Der experimentell ermittelte Wert von 5,5 mM stellt dagegen sicher eine obere Grenze dar. Die für diese Untersuchungen Faserpräparate hatten relativ hohe Einbau-Raten, die auch auf hohe ATPase-Aktivitäten und entsprechend hohe Phosphat-Anhäufung schließen lassen. Außerdem wurden 7 - 8 Fasern verwendet,

in späteren Versuchen nur 6.
Aus der relativ geringen Abhängigkeit der Einbau-Raten von der Phosphat-Konzentration der Inkubationslösung folgt, daß durch verschiedene ATPase-Aktivitäten verursachte Schwankungen der Phosphat-Konzentrationen einen zu vernachlässigenden Einfluß auf die Einbau-Raten haben.
Die für die Einbau-Reaktion verantwortlichen "sites" sind unter allen Versuchsbedingungen mit Phosphat gesättigt.

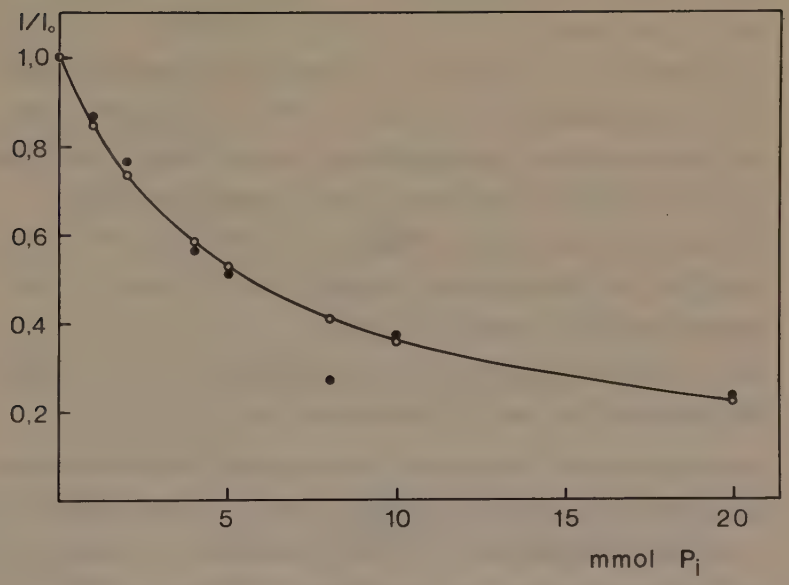


Abb. 18: Relative Einbau-Rate I/I_o (vgl. Abb. 17) als Funktion der Phosphat-Konzentration der Inkubationslösung. (●) = experimentelle Werte; (o) = berechnete Werte nach Gleichung: $I/I_o = 1/0{,}18\ C_1 + 1$.

4. Abhängigkeit von Einbau-Reaktion und ATPase-Aktivität von der Ca^{2+}-Ionen-Konzentration.

Zur Aktivierung der "natürlichen" kontraktilen Actomyosin-ATPase sind Ca^{2+}-Ionen in geringer Konzentration nötig (A. Weber, 1959). Dabei wirkt Ca^{2+} nicht auf das Actomyosin selbst, sondern auf das Regulatorprotein-System (vgl. Einl.). Wie Schädler an glycerinierten Fasern verschiedener Muskelarten nachgewiesen hat, zeigen die Aktivierungskurven der ATPase-Aktivitäten in Abhängigkeit vom negativen Logarithmus der Ca^{2+}-Konzentration (pCa) einen sigmoidalen Verlauf. 50%ige Aktivierung wird im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-6} M Ca^{2+} erreicht. Die Spannungsentwicklung verläuft parallel zur ATPase-Aktivität (Schädler, 1967).
Es war nun interessant, ob die Einbau-Reaktion eine ähnliche Abhängigkeit von der Ca^{2+}-Konzentration zeigen würde.

Verschiedene Ca^{2+}-Konzentrationen wurden durch Mischen von Kontraktions- und Erschlaffungslösung - also durch Ändern des Verhältnisses Ca-EGTA/EGTA - eingestellt. Dadurch wurden Ca^{2+}-Konzentrationen im Bereich von 10^{-8} bis 2×10^{-5} M erfaßt (s. Portzehl et al., 1964).
Zum Vergleich wurden auch ATPase-Messungen durchgeführt. Abb. 19 zeigt die Abhängigkeit der Einbau-Rate und der ATPase-Aktivität von der Ca^{2+}-Konzentration. Trotz verschiedener Methoden haben beide Kurven etwa den gleichen Verlauf. 50%ige Aktivierung wird bei der Einbau-Reaktion bei 2×10^{-7} M, bei der ATPase bei 3×10^{-7} M Ca^{2+} erreicht. Bei der höchsten

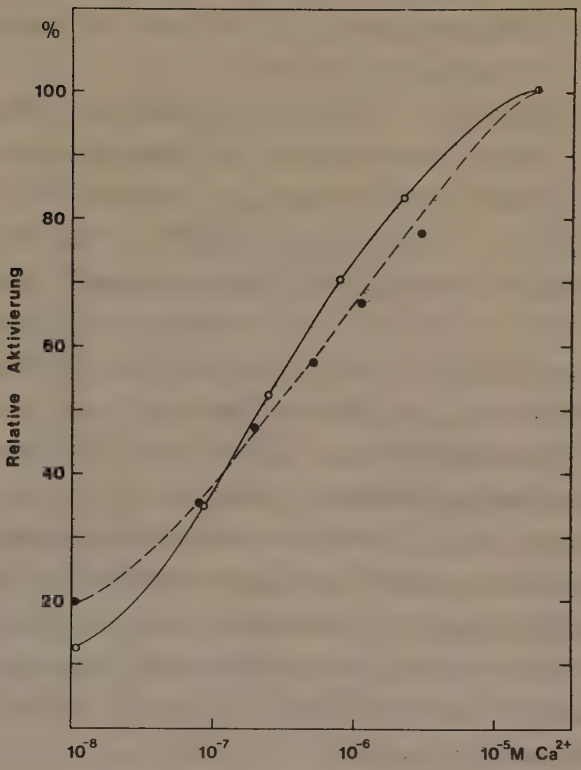


Abb. 19: Relative Aktivierung der Einbau-Reaktion (o——o) und der ATPase-Aktivität (•---•) durch Ca^{2+}-Ionen. Einbau-Reaktion und ATPase-Aktivität wurden in getrennten Versuchen gemessen.

mit dem Puffersystem erreichbaren Ca^{2+}-Konzentration ist die Einbau-Rate etwa 8 mal, die ATPase-Aktivität etwa 5 mal so hoch wie im Ca^{2+}-freien System.
Diese Ergebnisse stimmen mit den Werten für die ATPase aus früheren Untersuchungen von Rüegg und Tregear (1966) und Schädler (1967) überein. Bei höchster Ca^{2+}-Konzentration wurde eine 4,5 - 5,3 -fache (Schädler, 1967) bzw. 6fache (Rüegg und Tregear, 1966) Aktivierung gegenüber Ca^{2+}-Mangel gemessen. Bei vorgedehnten Fasern war der Aktivierungsgrad noch etwas höher. Dagegen stehen allerdings Befunde, nach denen speziell die Insektenflugmuskeln eine besonders geringe Ca^{2+}-Empfindlichkeit im Vergleich mit Skelettmuskeln und synchronen Insektenmuskeln haben sollen (vom Brocke, 1966; Maruyama et al., 1968). Dies wurde im Zusammenhang mit der zusätzlichen mechanischen Aktivierbarkeit der asynchronen Insektenflugmuskeln diskutiert. Neuere biochemische Untersuchungen zeigten jedoch, daß die Ca^{2+}-Empfindlichkeit der Insektenflugmuskeln ebensohoch ist wie die der Skelettmuskeln (Bullard et al., 1973).

4,1. Die enzymatischen Aktivitäten unter Ca^{2+}-Mangel-Bedingungen:

Allgemein gilt, daß die ATPase-Aktivität glycerinierter Fasern und Myofibrillen bei Ca^{2+}-Sättigung (ca. 10^{-5} M Ca^{2+}) 5 bis 10 mal höher ist als bei Ca^{2+}-Mangel (ca. 10^{-8} M Ca^{2+}), (Portzehl et al., 1969). Unter Ca^{2+}-Mangel-Bedingungen ist bei Muskelfasern keine Spannungsentwicklung zu beobachten, und die geringen Dehnungswiderstände, die manchmal noch meßbar sind,

könnten auch elastischen Strukturen außerhalb des Actomyosin-Systems zugeschrieben werden. Es wird daher vielfach angenommen daß das Actomyosin von Fasern und Fibrillen unter Ca^{2+}-Mangel-Bedingungen vollständig dissoziiert ist. In diesem Fall müßten aber die Unterschiede der enzymatischen Aktivitäten bei verschiedenen Ca^{2+}-Konzentrationen wesentlich größer sein. Myosin allein hat eine bis zu 100 mal geringere Aktivität als Ca^{2+}-aktiviertes Actomyosin (Portzehl et al., 1969; Eisenberg and Moos, 1968).
Schon vom Brocke (1966) hat vermutet (aufgrund der Wirkungen von Mg^{2+}), daß die in Ca^{2+}-freier Lösung gemessene ATPase-Aktivität einer Actomyosin-ATPase und nicht Myosin zuzuschreiben ist. Durch eingehenden Vergleich der ATPase-Aktivitäten von Myofibrillen und von Myosin unter verschiedenen ionalen Bedingungen hat Portzehl nachgewiesen, daß die ATPase-Aktivität der Fibrillen auch unter Erschlaffungsbedingungen einer Actomyosin-ATPase entspricht (Portzehl et al., 1969).
Dies dürfte auch für die glycerinierten Fasern der Insektenflugmuskeln zutreffen, bei denen das Verhältnis von Ca^{2+}-aktivierter ATPase zur nichtaktivierten ebenfalls zwischen 5 und 10 liegt (s. o.).

Wenn also unter Erschlaffungsbedingungen die Actomyosin-ATPase noch aktiv ist, ist es nicht erstaunlich, daß auch in Erschlaffungslösung noch eine Erhöhung der Einbau-Rate durch Dehnungszyklen erreicht werden konnte (Abb. 20). Die absoluten Raten waren 5 - 6 mal niedriger als bei Ca^{2+}-Aktivierung, doch war der Dehnungseffekt auch bei Ca^{2+}-Mangel-Bedingungen deutlich.

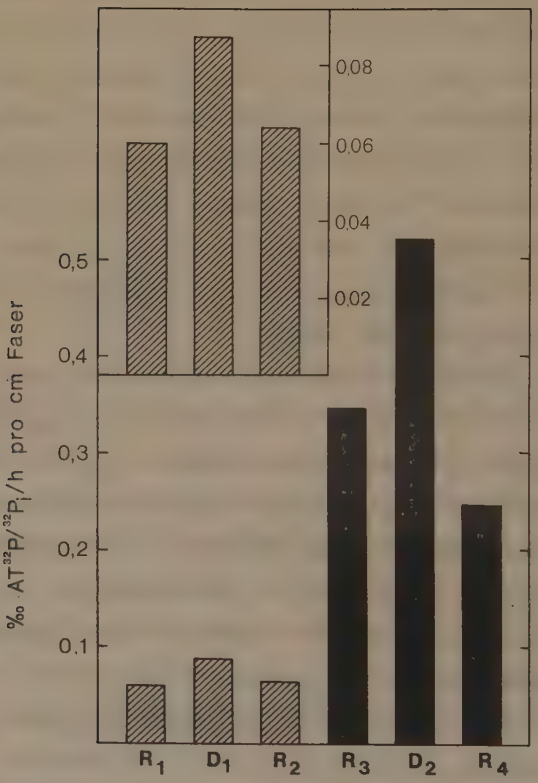


Abb. 20: Erhöhung der Einbau-Rate durch Dehnung: Vergleich von Ca^{2+}-Mangel und Ca^{2+}-Sättigung. Faserbündel in sechs aufeinanderfolgenden Bädern, bei R_{1-4} isometrisch, bei $D_{1,2}$ mit ⎍⎍-Dehnung (1 Hz, 1 % L_o).
Schraffierte Säulen: 10^{-8} M Ca^{2+}; Schwarze Säulen: 2 x 10^{-5} M Ca^{2+}.
Das eingesetzte Diagramm zeigt in größerem Maßstab nochmals die Einbau-Raten für 10^{-8} M Ca^{2+}.

5. Die Temperatur-Abhängigkeit der Einbau-Reaktion

Die Temperatur-Abhängigkeit der Einbau-Reaktion wurde im Bereich zwischen 10° und 20° C untersucht. Wird die Einbau-Rate semilogarithmisch gegen die reziproken Werte der absoluten Temperatur (1/T) aufgetragen (Arrhenius plot), so ergibt sich eine Gerade (Abb. 21). Der Temperaturkoeffizient (Q_{10}) beträgt 4. Dieser Wert ist für eine enzymatische Reaktion ziemlich hoch und bedeutet, daß eine hohe Aktivierungsenergie benötigt wird. Die Aktivierungsenergie E kann nach der Gleichung:

$$E = \frac{R \times T^2 \ln Q_{10}}{10}$$

berechnet werden (Dixon and Webb, 1964). Für $Q_{10} = 4$ beträgt die Aktivierungsenergie 23 600 cal/Mol.

Diese Werte entsprechen etwa denen aus anderen Untersuchungen an glycerinierten Insektenflugmuskeln. Für ATPase und mechanische Reaktionen (Frequenz der isometrischen Oszillationen, Zeitkonstante des Spannungsabfalls) wurden Temperaturkoeffizienten zwischen 3 und 4 gemessen (Schädler et al., 1969, 1971; Rüegg, 1972).

In der Literatur wurde mehrfach berichtet, daß die Temperatur-Abhängigkeit der Actomyosin-ATPase einen biphasischen Verlauf hat: Im Arrhenius plot tritt bei 16° C eine Diskontinuität auf, wobei der Q_{10} unter 16 ° C einen hohen Wert hat und über 16° einen niedrigeren, der etwa dem der Myosin-ATPase entspricht. (Levy et al., 1959; Barany, 1967; Kominz, 1970). Es wurde vorgeschlagen, daß der hohe Temperaturkoeffizient bei niedrigeren

Temperaturen auf eine erhöhte Dissoziation des Actomyosins zurückzuführen und damit als Artefakt zu bewerten sei. Nach den Untersuchungen von Barouch und Moos (1971), die bei physiologischer Ionenstärke mit H-Meromyosin und Actin durchgeführt wurden, ist der bemerkenswert hohe Temperaturkoeffizient jedoch eine reale Eigenschaft der Actomyosin-ATPase. In ihren Untersuchungen betrug der Q_{10} sogar 5!

Der hohe Temperaturkoeffizient der Einbau-Reaktion paßt also gut in den Rahmen dessen, was über die Temperatur-Abhängigkeit der mechanischen und enzymatischen Aktivitäten des Actomyosins bekannt ist.

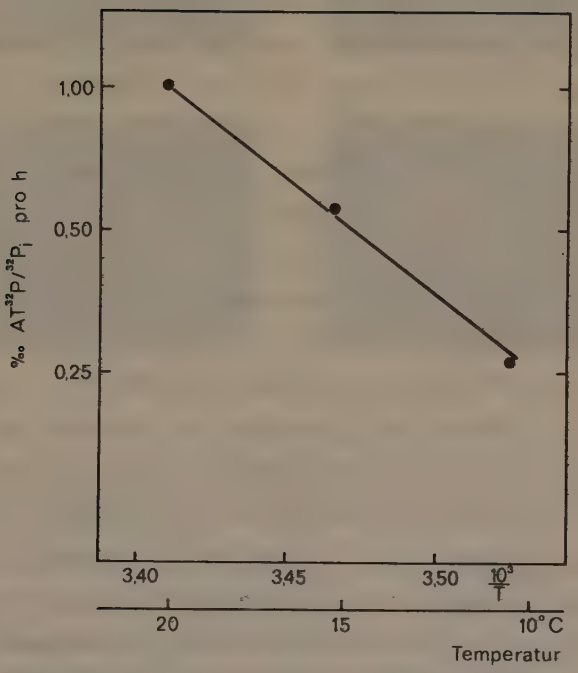


Abb. 21: Abhängigkeit der Einbau-Rate (pro Faserbündel) von der Temperatur. Mittelwerte aus zwei Doppelversuchen.

MECHANISCHE EXPERIMENTE

6. Dehnungsaktivierung:

a) Spannungsreaktionen auf rasche Längenänderungen:

Die Fähigkeit der Insektenflugmuskeln zur oszillatorischen Arbeitsweise beruht auf der sog. "Dehnungsaktivierung" von Spannung (Jewell and Rüegg, 1966) und ATPase-Aktivität (Rüegg and Tregear, 1966).
Auf ruckartige rechteckförmige Längenänderungen antworten die Muskelfasern in folgender Weise (Abb. 22 und 23; die Zahlen in Klammern beziehen sich auf das Schema in Abb. 23):
Bei Dehnung folgt einem unmittelbaren Spannungsanstieg (1) ein schneller Spannungsabfall (2). Nach wenigen msec (7 - 10 msec bei 20°C) steigt die Spannung wieder an, wobei sie einen weit höheren Wert erreichen kann als beim ersten passiven Spannungsanstieg (besonders deutlich in Abb. 22 b). Dieser zweite verzögerte Spannungsanstieg (3) ist für die Dehnungsaktivierung verantwortlich. Er zeigt die Merkmale einer aktiven Reaktion der Muskelfasern wie ausgeprägte Temperaturabhängigkeit (Q_{10} = 3,5 - 4) und Abhängigkeit von der chemischen Zusammensetzung der Inkubationslösung. Die Anwesenheit von Mg-ATP und Ca^{2+} ist Voraussetzung; die Zeitkonstante des Spannungsanstiegs und die Höhe der maximalen Spannung werden durch ADP und P_i beeinflußt (Rüegg et al., 1971).
Bei größeren Dehnungsamplituden (> 1% L_o) treten Schwingungen (Oszillationen) der isometrischen Spannung auf (Abb. 22 c),

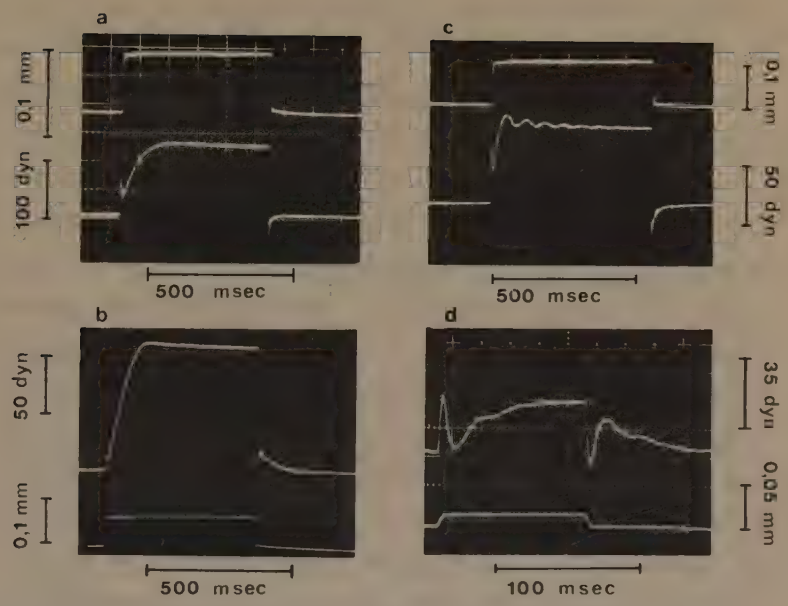


Abb. 22: Zeit-Spannungskurven bei rechteckförmiger Dehnung und Entdehnung:

a) verzögerter Spannungsanstieg bei Dehnung um 1,5 % L_o

b) verzögerter Spannungsanstieg bei Dehnung um 1,25 % L_o; nach Entdehnung "Überschießen" und anschließend Deaktivierungsphase der reaktiven Spannung.

c) Oszillationen der isometrischen Spannung nach Dehnung um 2 % L_o.

d) Spiegelbildliche Symmetrie des Spannungsverlaufs bei kleiner Dehnungsamplitude (0,25 %).

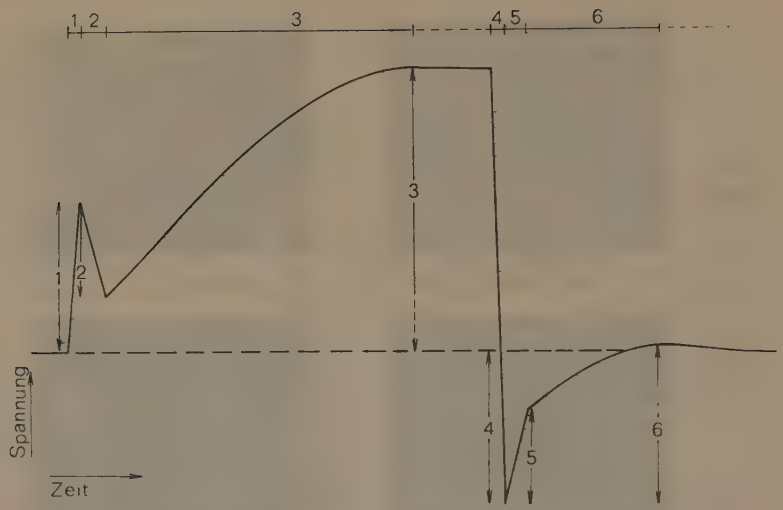


Abb. 23: Schema des zeitlichen Spannungsverlaufs bei einem ⎍⎍-Dehnungszyklus von etwa 100 msec; Unterteilung in die zeitlichen Phasen (1) bis (6) und dazugehörige maximale Spannungsänderungen:

1 = elastischer Spannungsanstieg = Dehnungswiderstand
2 = viskoelastischer Spannungsabfall
3 = verzögerter Spannungsanstieg nach Dehnung
4 = elastischer Spannungsabfall
5 = viskoelastischer Spannungsanstieg
6 = verzögerter Spannungsanstieg nach Entdehnung

Auf diese Einteilung wird in den folgenden Untersuchungen Bezug genommen.

die ebenfalls von der Temperatur und von chemischen Parametern abhängig sind (Schädler et al., 1969). Ihre Frequenz stimmt mit der Wechselzahl der Actomyosin-ATPase überein. Diese Oszillationen wurden als Indiz für eine Synchronisierung der Querbrücken durch die ruckartigen Längenänderungen angesehen (Schädler et al., 1971).

Während im verzögerten Spannungsanstieg überwiegend aktive chemomechanische Prozesse repräsentiert werden, ist die schnelle Anfangsphase (1 und 2) durch passive elastische und viskoelastische Eigenschaften der Muskelfasern bedingt. Die Höhe des unmittelbar mit der Längenänderung gekoppelten elastischen Spannungsanstiegs (1) ist ein Maß für den Dehnungswiderstand der Muskelfasern; sie ist in Anwesenheit von ATP von der Ca^{2+}-Konzentration abhängig und im Rigorzustand (ohne ATP) besonders hoch. Man nimmt daher an, daß die Höhe des Dehnungswiderstands proportional der Zahl der angehefteten Querbrücken ist. Ob die Querbrücken allein für den Dehnungswiderstand verantwortlich sind, ist allerdings noch ungeklärt. Für den folgenden Spannungsabfall (2) sind viskoelastische Eigenschaften der Muskelfasern verantwortlich. Nach der Theorie von Huxley u. Simmons (1971) wird der Spannungsabfall durch eine Rotation der angehefteten Querbrücken von der abgewinkelten in die senkrechte Stellung bewirkt.

Bei tieferen Temperaturen, bei denen aktive Prozesse wesentlich langsamer ablaufen, zeigt es sich, daß dieser schnelle "passive" Spannungsabfall aus zwei Komponenten besteht (Abb. 24): Auf eine temperaturunabhängige Phase (7 - 10 msec) folgt ein

weiterer Spannungsabfall, dessen zeitlicher Verlauf in hohem Grade temperaturabhängig ist ($Q_{10} > 5$).
Eine Deutung dieser Phase ist noch nicht möglich.

Der auf Entdehnung folgende Spannungsverlauf ist - zumindest in der elastischen und viskolelastischen Phase - spiegelbildlich zum oben beschriebenen Verlauf nach Dehnung.
Auf einen elastischen Spannungsabfall (4) folgt ein viskoelastischer Spannungsanstieg (5). Dieser ist allerdings oft nicht von dem sich anschließenden verzögerten Spannungsanstieg (6) abzugrenzen. Der verzögerte Spannungsanstieg zeigt oft ein "Überschießen", bevor er das stationäre Niveau erreicht (Abb. 22 b). Manche Autoren sprechen hier von einer "Deaktivierungsphase".
Bei kleinen Amplituden (unter 0,5 % L_o) verläuft die ganze Entdehnungsphase spiegelbildlich zur Dehnungsphase (Abb. 22 d).
Im Übrigen sind die auf Entdehnung folgenden Spannungsreaktionen aber sehr variabel und können zur Zeit noch nicht systematisch beschrieben werden. Die folgenden Untersuchungen werden deshalb auf den verzögerten Spannungsanstieg nach Dehnung (3) bezogen.

Ebenso, wie an der viskoelastischen Anfangsphase (2) offenbar aktive Prozesse beteiligt sind, dürfte der verzögerte Spannungsanstieg nicht nur durch aktive, mit chemischen Reaktionen gekoppelte Prozesse bedingt sein, sondern auch durch passive elastische Reaktionen. Dafür spricht die Beobachtung, daß bei ungenügender ATP-Versorgung der Fasern die maximale Spannung

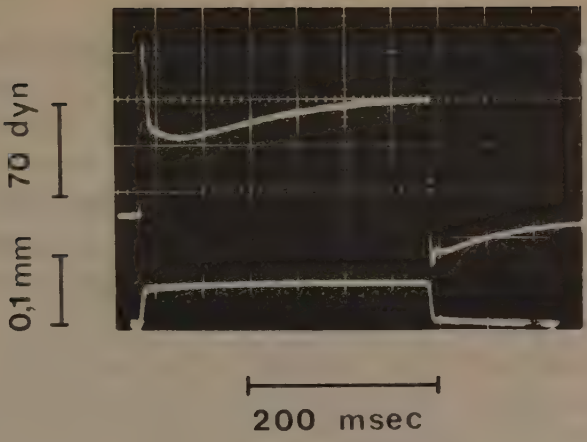


Abb. 24: Spannungsverlauf bei 10° C: Im viskoelastischen Spannungsabfall (2) tritt eine zweite (stark temperaturabhängige) Komponente auf.

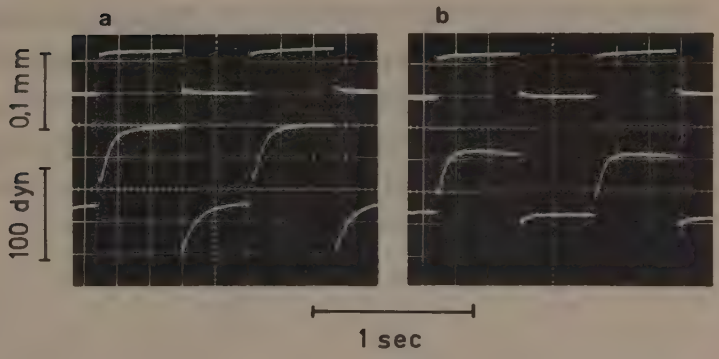


Abb. 25: Einfluß der ATP-Konzentration auf Spannungsverlauf und Spannungshöhe: a) 5 mM Mg-ATP, b) 15 mM Mg-ATP Sonstige ionale Bedingungen: 4 mM Ca-EGTA, 10 mM Na-azid, 20 mM Imidazol/HCl-Puffer, pH 6,7, 1 mM Phosphat.

höher ist als bei optimaler ATP-Konzentration, so daß ein Teil der Spannung wohl durch "rigor links" (s. Bremel and Weber, 1972) bedingt ist (Abb. 25).

Welcher Mechanismus der Dehnungsaktivierung zugrunde liegt, ist noch nicht bekannt. Diskutiert wird z. B. die Beteiligung von Tropomyosin (Bullard et al., 1973; White and Thorson, 1973) oder von Paramyosin (White and Thorson, 1973).
Unabhängig von dieser ungeklärten Problematik ist es jedoch offensichtlich, daß die Zahl der gleichzeitig tätigen Querbrücken nach Längensprüngen erhöht wird, sei es infolge einer Synchronisierung (Pringle, 1967; Schädler et al., 1969, 1971) oder durch Änderung von Ratenkonstanten einzelner Teilschritte des Querbrückenzyklus (Thorson and White 1969).

Bei kleineren Amplituden folgt der zeitliche Verlauf der verzögerten Spannung annähernd einer Exponentialfunktion. Diese Tatsache zusammen mit der Annahme, daß durch Längenänderungen die Wahrscheinlichkeit bzw. die Geschwindigkeitskonstante für das Ablösen der Querbrücken erhöht wird, haben Thorson und White (1969) zur Grundlage mathematischer Beschreibungen der Spannungskinetik gemacht.

b) Erhöhung von ATPase-Aktivität und Einbau-Rate durch Dehnung:

Die mechanische Dehnungsaktivierung der Insektenflugmuskeln ist mit erhöhter ATPase-Aktivität gekoppelt. Dieser Parallelismus ist in verschiedenen Arbeiten eingehend untersucht worden (Rüegg and Tregear, 1966; Steiger and Rüegg, 1969; Breull, 1971; Breull et al.,,1973; Pybus and Tregear, 1972).

Wie in einigen bereits beschriebenen Versuchen angedeutet wurde, ist auch die Einbau-Reaktion mechanisch aktivierbar (vgl. Ulbrich and Rüegg, 1971). Abb. 26 zeigt zunächst, daß durch repetitive Rechteckdehnungen die Einbau-Reaktion ebenso wie die ATPase-Aktivität auf etwa das Doppelte erhöht wird. Die Effekte sind reversibel und reproduzierbar.
(Alle 6 Werte wurden von einem Faserbündel erhalten, ATPase-messungen und Austauschversuch wurden aber mit verschiedenen Präparaten durchgeführt.)
Um die chemomechanische Koppelung sicherzustellen, war zu untersuchen, welchen Einfluß Amplitude, Frequenz und Dauer der Dehnungzyklen auf die Einbau-Rate haben.

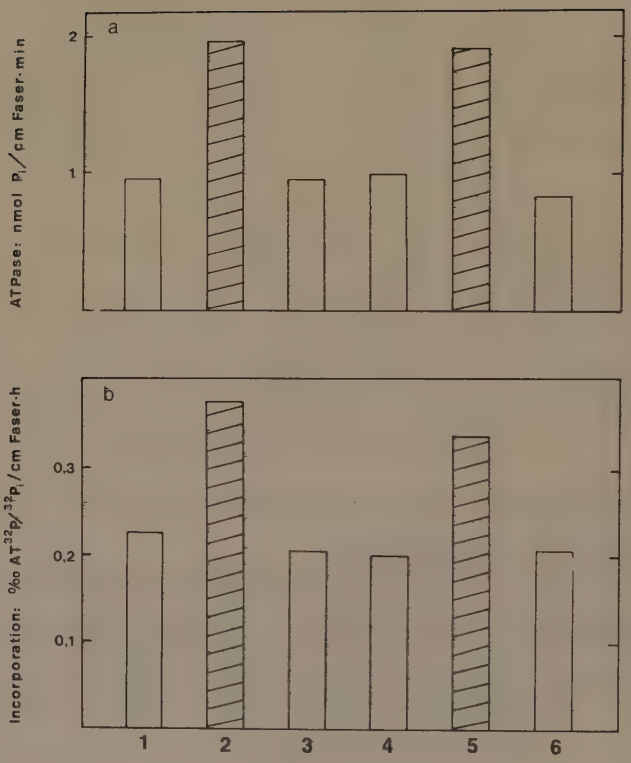


Abb. 26: Erhöhung der ATPase-Aktivität (Abb. 26 a) und der Einbau-Rate (Abb. 26 b) durch rechteckförmige Dehnungszyklen. Sechs aufeinanderfolgende Inkubationsperioden je eines Faserbündels in $K_o$ntraktionslösung. □ = isometrische Kontraktion ("Ruhe"), ▨ = ⎍⎍⎍-Dehnungen (1 Hz, 1 % L_o).

7. Abhängigkeit von Einbau-Reaktion, ATPase-Aktivität und Spannung von der Amplitude rechteckförmiger Dehnungszyklen:

Bei der Frequenz von 1 Hz, wobei die Dehnungszeit gleich der Entdehnungszeit (also 500 msec) war, wurde die Amplitude der Längenänderungen variiert, und zwar von 0,25 % bis 3 % L_o. Es wurden auch Untersuchungen der ATPase-Aktivität durchgeführt, da zwar die Korrelation zwischen dynamischer Spannung und ATPase nachgewiesen worden ist (Breull, 1971), aber nicht eigens in Abhängigkeit von der Amplitude.
In Abb. 27 sind die dehnungsinduzierte Einbau-Rate, die dehnungsinduzierte ATPase-Aktivität und die verzögerte Spannung in Abhängigkeit von der Amplitude dargestellt. Alle drei Parameter sind nicht in linearer Weise von der Amplitude abhängig, sondern sie streben offenbar einem Sättigungswert zu. Am wirksamsten sind Amplituden unter 1 % L_o. Durch weitere Erhöhung der Amplitude wird eine geringere zusätzliche Aktivierung erreicht. Diese Abhängigkeit von der Dehnungsamplitude deutet darauf hin, daß Reaktionen direkt mit der Bewegung der Querbrücken zusammenhängen, denn eine Längenänderung von 1 % L_o entspricht einer Ruderbewegung der Querbrücken.

Bei Amplituden unter 1 % L_o ist die Einbau-Rate annähernd mit dem Quadrat der Amplitude korreliert. Dieser Befund erinnert daran, daß auch bei sinusförmigen Dehnungen eine quadratische Abhängigkeit der ATPase und der Arbeitsleistung von der Amplitude besteht, hier allerdings auch noch bei größeren Amplituden (Rüegg und Stumpf, 1969).

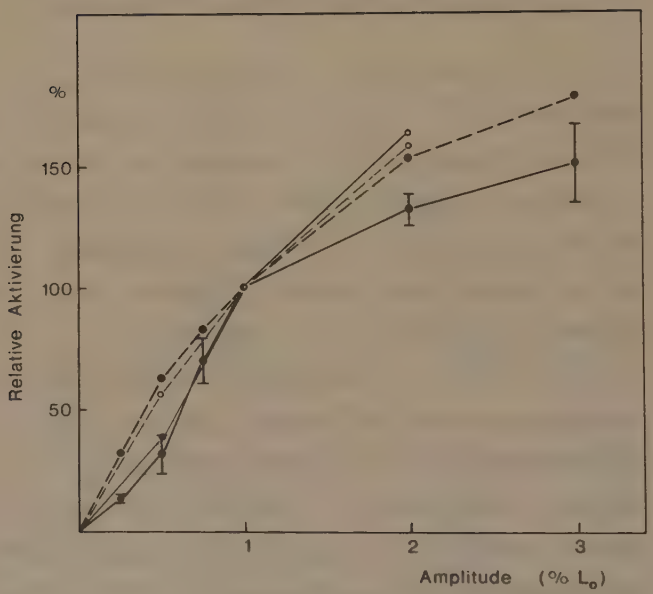


Abb. 27: Zunahme der Aktivierung von Einbau-Reaktion (●——●), ATPase-Aktivtät (o——o) und dazugehöriger verzögerter Spannung (●---● zur Einbau-Reaktion, o---o zur ATPase) durch Erhöhung der Amplitude von ⎍⎍ -Dehnungen (1 Hz). Die Werte beziehen sich nur auf die durch Dehnung induzierten Einbau-Raten bzw. ATPase-Aktivitäten nach Abzug der Ruhe-Werte. Dies gilt auch für alle folgenden Darstellungen. Referenzwert: 1 % L_o Für die Einbau-Raten sind die mittleren Abweichungen der Mittelwerte angegeben.

8. Untersuchung der Dehnungsdauer:

Bei gleichbleibender Frequenz und Amplitude (1 Hz, 1 % L_o) wurde die Dehnungsdauer variiert, und zwar von 5 msec bis 500 msec. Für den Bezugswert (= 100 %), der bei allen Experimenten mituntersucht wurde, wurde eine Dehnungsdauer von 100 msec gewählt.

Abb. 28 zeigt die dehnungsinduzierte Einbau-Rate als Funktion der Dehnungszeit pro Dehnungszyklus. Darunter ist in demselben Zeitmaßstab der Spannungsverlauf während eines Dehnungszyklus dargestellt. Die Kinetik beider Kurven stimmt in der schnellen Anfangsphase bis etwa 100 msec weitgehend überein. Bei längeren Dehnungszeiten geht die Einbau-Reaktion offenbar in eine steady state-Phase über, während die Spannung langsam wieder abfällt.

Diese Zeitkurve der Einbau-Reaktion kann in kinetischer Hinsicht analysiert werden wie andere Enzymreaktionen, die unter üblichen biochemischen Versuchsbedingungen erhalten werden. Die Einbau-Rate (pro h Inkubationszeit) entspricht einem Substratverbrauch bzw. Produktfreisetzung, da die Rate nicht auf Dehnungszeit umgerechnet worden ist; die Dehnungszeit pro Zyklus entspricht einer Reaktionszeit.

Werden die experimentellen Werte der Anfangsphase (I_e) von den entsprechenden extrapolierten Werten der steady state-Phase (I_s) subtrahiert, so ergibt das semilogarithmische Diagramm dieser Differenzen, aufgetragen gegen die Zeit, eine Gerade (Abb. 29). Die Anfangskinetik der Einbau-Reaktion folgt also einer Exponentialfunktion, die durch eine einzige

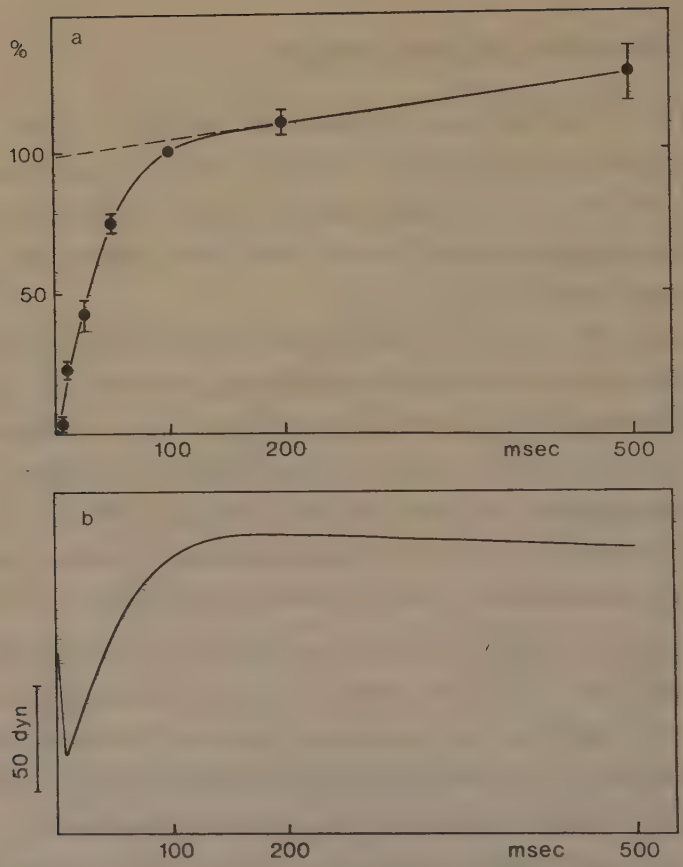


Abb. 28: a) Dehnungsinduzierte (relative) Einbau-Rate als Funktion der Dehnungsdauer von rechteckförmigen Dehnungszyklen (Frequenz: 1 Hz, Amplitude: 1 % L_o). Referenzwert: 100 msec = 100 %

b) zeitlicher Verlauf der Spannung während eines Dehnungszyklus.

Ratenkonstante beschrieben werden kann. Als Wert dieser Konstante wurde 27 sec^{-1} ermittelt.
Der verzögerte Spannungsanstieg ist nur bei kleinen Amplituden (unter 1 % L_o) exponentiell. Es ist aber trotzdem wünschenswert, Ratenkonstanten wenigstens näherungsweise zu ermitteln, um zwischen Spannungskinetik und Enzymkinetik vergleichen zu können. Für die in Abb. 28 dargestellte Spannungskurve wurde eine Ratenkonstante von 23 sec^{-1} gemessen.
Zwischen den Ratenkonstanten verschiedener Faserpräparate wurden große Unterschiede festgestellt.(Innerhalb eines Präparates waren die Werte aber konstant.) Die Werte lagen zwischen 23 sec^{-1} und 46 sec^{-1}. Der Mittelwert für die bei den Austausch-Versuchen registrierten Spannungen war 31,5 sec^{-1}, also vergleichbar mit der Ratenkonstante der Einbau-Reaktion.

Daß sich die Kinetik der dehnungsinduzierten ATPase prinzipiell ähnlich verhält, geht aus der Arbeit von Breull et al. (1973) aus Fig. 6 hervor.

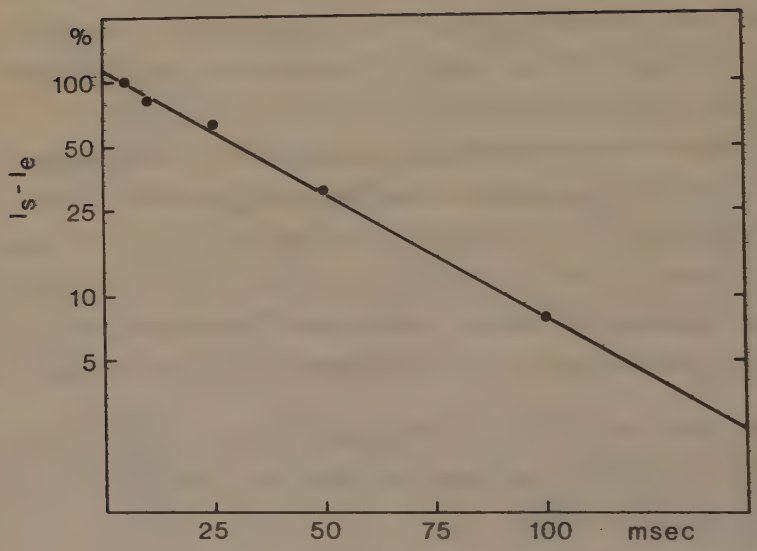


Abb. 29: Semilogarithmisches Diagramm der Differenzen ($I_s - I_e$) gegen die Dehnungszeit (s. Text). I_e = Einbau-Rate der Anfangsphase, I_s = (extrapolierte) Einbau-Rate der steady state Phase.

9. Abhängigkeit der Einbau-Reaktion von der Frequenz rechteckförmiger Dehnungszyklen:

Der Einfluß der Frequenz wurde bei jeweils gleich langen Dehnungs- und Entdehnungszeiten untersucht.
In Abb. 30 ist die dehnungsinduzierte relative Einbau-Rate als Funktion der Frequenz aufgetragen. Die Kurve steigt mit zunehmender Frequenz zunächst an, erreicht ein Optimum bei 5 Hz und fällt bei höheren Frequenzen bis 60 Hz wieder ab. Dieses Ergebnis ist zunächst etwas überraschend. Von einer Änderung der Frequenz sind grundsätzlich zwei extreme Effekte zu erwarten. Die erste Möglichkeit: Die Einbau-Rate ist nur von der stationären Dehnungs- bzw. Spannungsphase abhängig. Dann sollte eine Änderung der Frequenz keine Wirkung haben, da bei allen Frequenzen die Dehnungszeit 50 % der gesamten Versuchszeit betrug. Die zweite Möglichkeit: Die Aktivierung der Einbau-Reaktion ist streng mit dem Prozess des Dehnungsschritts gekoppelt. Dann sollte die Einbau-Rate linear mit der Frequenz ansteigen. Die Art der experimentell ermittelten Kurve läßt schon darauf schließen, daß mindestens zwei verschiedene Faktoren wirksam sind. Um die Frequenzeffekte zu verstehen, muß die vorangegangene Untersuchung der Dehnungszeit herangezogen werden. Denn jeder Frequenz entspricht eine bestimmte Dehnungszeit, der eine entsprechende Einbau-Rate pro Zyklus mit Hilfe der in Abb. 28 dargestellten Abhängigkeit zugeordnet werden kann. Bei niedrigen Frequenzen unter 5 Hz (was 100 msec Dehnungszeit entspricht) wird mit

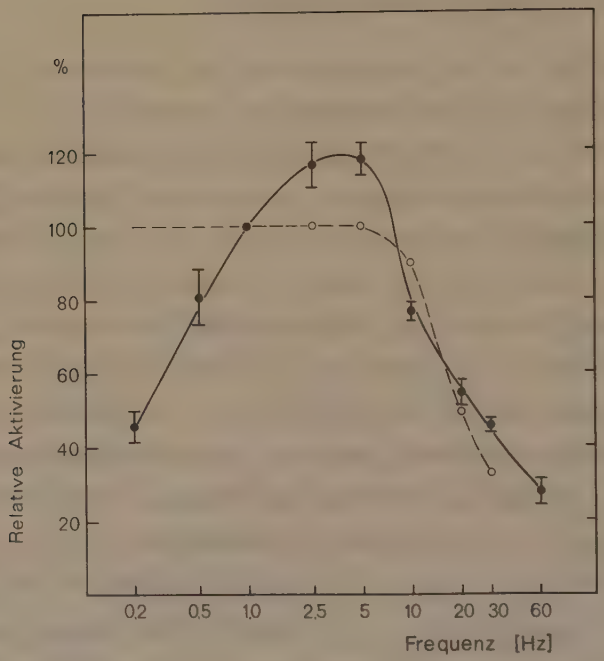


Abb. 30: Die relative Aktivierung der dehnungsinduzierten Einbau-Rate (●——●) und der maximalen verzögerten Spannung (3)o---o in Abhängigkeit von der Frequenz rechteckförmiger Dehnungszyklen.
Dehnungszeit : Entdehnungszeit = 1 : 1; Amplitude: 1 %. Referenzwert: 1 Hz = 100 %.

jedem Dehnungszyklus die schnelle Anfangsphase mit der relativ größten Aktivierung ganz erfaßt. Durch Erhöhung der Frequenz in diesem Bereich, also der Zahl der Dehnungszyklen, muß also die Einbau-Rate erhöht werden, was in der Tat der Fall ist. Daß keine lineare Abhängigkeit besteht, liegt wohl daran, daß noch ein mehr oder weniger ins Gewicht fallender Betrag der stationären Phase dazukommt.
Bei hohen Frequenzen mit Dehnungszeiten von weniger als 100 msec werden die maximalen Werte sowohl der Spannung als auch der Einbau-Rate nicht mehr erreicht. Die Einbau-Rate ist von der Dehnungszeit in fast linearer Weise abhängig. In diesem Bereich sollte also die Dehnungszeit pro Zyklus, nicht die Frequenz der bestimmende Faktor sein. Daß die Einbau-Rate in diesem Bereich von der Frequenz unabhängig sein muß, ist auch folgendermaßen zu begründen: Die Einbau-Rate pro Zyklus ist über die jeweilige Dehnungszeit zu integrieren und dieses Produkt muß mit der Frequenz multipliziert werden, um mit der Frequenzkurve verglichen werden zu können. Da das Produkt aus Dehnungszeit und Frequenz aber konstant ist, ist der entscheidende Parameter die der jeweiligen Dehnungszeit bzw. Frequenz zugehörige momentane Einbau-Rate. Die gleichen Überlegungen gelten auch für die Spannungskurve. Daher ist bei hohen Frequenzen die Einbau-Rate mit dem jeweiligen Maximalwert der verzögerten Spannung (3) korreliert (Abb. 30).
Daß die Frequenzkurve tatsächlich durch die Kinetik der Einbau-Reaktion bedingt ist, soll Abb. 31 verdeutlichen.

Hier wurden die experimentell erhaltenen Werte (s. Abb. 30) mit den Werten verglichen, die anhand der Zeitkurve (Abb. 28) berechnet wurden. Als 100 %-Wert ist hier 5 Hz gesetzt, der dem Bezugswert von 100 msec Dehnungszeit entspricht.
Betrachten wir zunächst den Bereich hoher Frequenzen, bzw. kurzer Dehnungszeiten pro Zyklus: Als theoretische Werte sind die über die Dehnungszeit integrierten Einbau-Raten, multipliziert mit der Frequenz, eingesetzt. (Fast die gleiche Kurve ergibt sich, wenn man die zur jeweiligen Dehnungszeit gehörigen maximalen Raten aus Abb. 28 einträgt.)
Die berechneten Werte stimmen mit den experimentell ermittelten gut überein, bis in den Bereich von 5 Hz. Bei niedrigeren Frequenzen gilt dieser Zusammenhang nicht mehr, weil hier keine einfache Beziehung zwischen Einbau-Rate und Dehnungszeit mehr besteht, sondern zur schnellen exponentiellen Anfangsphase eine langsame steady state-Phase dazukommt.
Da bei niedrigen Frequenzen in jedem Dehnungszyklus die ganze Anfangsphase enthalten ist, sollte die Einbau-Rate dem Produkt aus maximaler Rate pro Zyklus und der Frequenz proportional sein. Die experimentellen Werte sind um einen gewissen Betrag höher als die berechneten, was auf den Anteil der langsamen Phase zurückzuführen sein dürfte.

Die Frequenzeffekte bestätigen erneut, daß die dehnungsinduzierte Einbau-Reaktion mit der Kinetik der chemomechanischen Reaktionen gekoppelt ist.

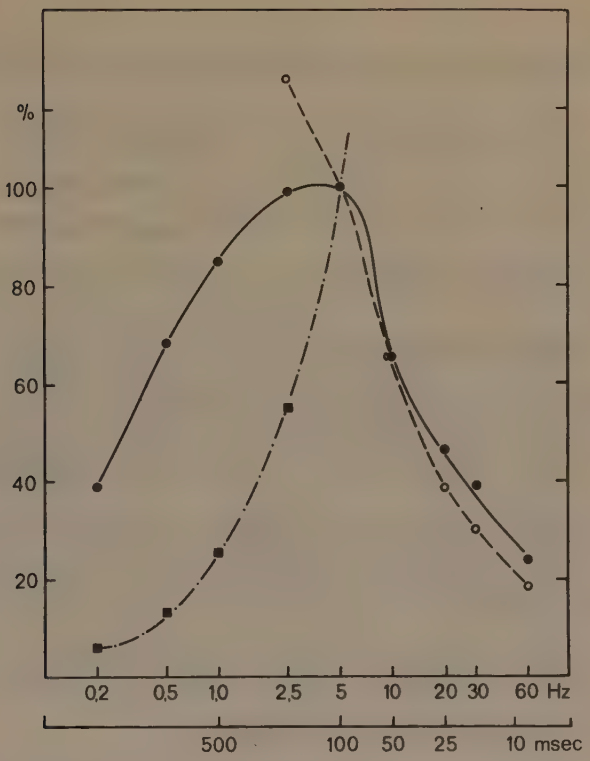
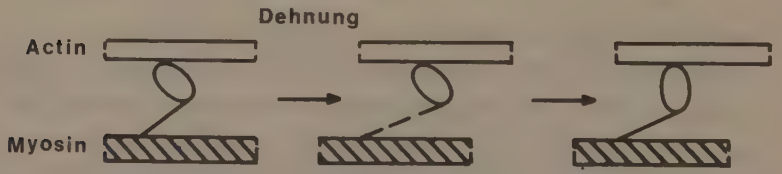


Abb. 31: Vergleich der experimentellen Werte der Frequenzkurve (Abb. 30) mit den aufgrund der Zeitabhängigkeit (Abb. 28) zu erwartenden theoretischen Werte bei verschiedenen Frequenzen. Jeder Frequenz entspricht eine bestimmte Dehnungszeit pro Zyklus (untere Skala), der aufgrund der in Abb. 28 gezeigten Abhängigkeit eine bestimmte Dehnungsrate zugeordnet werden kann. ●——● experimentelle Werte aus Abb. 30, umgerechnet für 5 Hz = 100 %; ■-·-·-■ Produkt aus maximaler Einbau-Rate pro Zyklus und der Frequenz; o---o Produkt aus der über die Dehnungszeit integrierten Einbau-Rate und der Frequenz.

9,1. Wirkung hoher Frequenzen auf mechanische Phänomene:

Einen interessanten Effekt zeigte die Erhöhung der Frequenz auf die passive Anfangsphase des Spannungsverlaufs: Der viskoelastische Spannungsabfall (2) nach Dehnung wurde mit zunehmender Frequenz geringer, während sich der erste, elastische Spannungsanstieg (1) kaum änderte (Abb. 32 und 33).
Folgende Erklärung bietet sich an: Wie schon in den vorangeangenen Untersuchungen festgestellt wurde, erreicht bei hohen Frequenzen mit entsprechend kurzen Dehnungszeiten pro Zyklus (unter 100 msec) der verzögerte Spannungsanstieg (3) nicht den maximal möglichen Wert. Das gilt auch für den Spannungsanstieg (6) nach Entdehnung. Der viskoelastische Spannungsabfall (2) wird nach der Theorie von Huxley und Simmons (1971) durch eine Rotation der noch angehefteten Querbrücken bewirkt, die dadurch in die senkrechte, entspannte Stellung übergehen (s. Schema).



Wenn nun nach einem auf Entdehnung folgenden unvollständigen Spannungsanstieg (6) nur ein geringer viskoelastischer Spannungsabfall (2) nach Dehnung erfolgt, spricht dies dafür, daß die Querbrücken bei Beginn des Dehnungsschritts noch nicht vollständig abgewinkelt waren und demzufolge auch keine vollständige Rotationsbewegung in der Gegenrichtung ausführen

können. Dies würde aber bedeuten, daß die Querbrücken durch die schnellen Längenänderungen zu synchroner Tätigkeit gezwungen werden. Daß sich die Zahl der angehefteten Querbrücken nicht oder wenig ändert, wird dadurch belegt, daß sich der elastische Spannungsanstieg (1), der als Maß für den Dehnungswiderstand und die Zahl der angehefteten Querbrücken gilt, nicht wesentlich ändert.
Die Wirkung der Frequenzerhöhung auf die vikoelastische Spannungsphase kann demnach als ein weiteres Indiz für eine Synchronisierung von Querbrückenzyklen durch Längensprünge angesehen werden.
(Die Frequenzerhöhung als solche ist natürlich nicht die primäre Ursache für die beschriebenen Effekte, sondern die damit verbundenen kurzen Dehnungszeiten pro Zyklus, die nur einen unvollständigen Spannungsanstieg zulassen.)

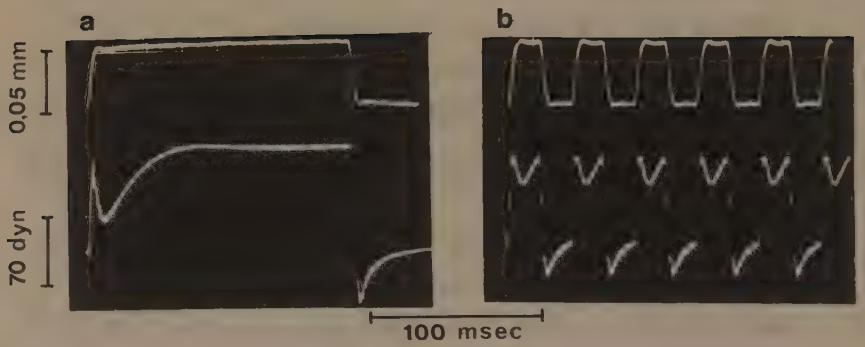


Abb. 32: Abnahme des viskoelastischen Spannungsabfalls (2) bei hohen Frequenzen (bzw. kurzen Dehnungszeiten); Zeit-Spannungsdiagramm bei a) 3,5 Hz, b) 30 Hz.

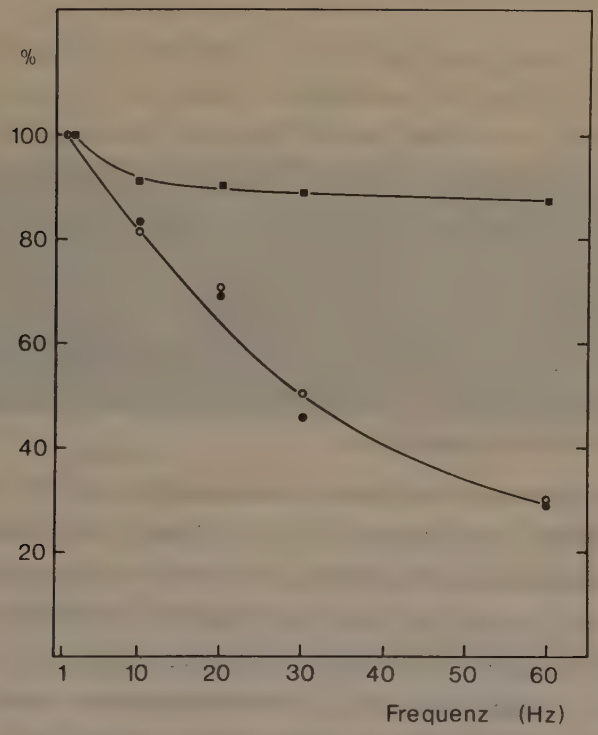


Abb. 33: ■—■ Elastischer Spannungsanstieg (1), (●) viskoelastischer Spannungsabfall (2) und (o) verzögerte Spannung nach Entdehnung (6) unter dem Einfluß hoher Frequenzen (⎍⎍⎍ -Dehnungen, 1 % L_o).

10. Die Frequenzabhängigkeit bei sinusförmigen Dehnungszyklen - Korrelation der Einbau-Reaktion mit Arbeit oder Leistung?

Die Wirkung von sinusförmigen Dehnungen auf die ATPase-Aktivität und das mechanische Verhalten von Insektenflugmuskeln ist in den letzten Jahren von mehreren Arbeitsgruppen untersucht worden. Anhand der Längen-Spannungs-Diagramme (Bsp. s. Abb. 34) lassen sich Arbeit und Leistung der Muskelfasern messen und in Beziehung zur ATPase-Aktivität setzen. So konnte der Nutzeffekt der ATPase in Abhängigkeit von der Frequenz bestimmt werden (Steiger und Rüegg, 1969). Andererseits sind kinetische Analysen schwieriger als bei raschen Längensprüngen.

Die Wirkung sinusförmiger Dehnungszyklen auf die Einbau-Reaktion wurde zunächst mit der Wirkung rechteckförmiger Dehnungszyklen verglichen. Beide Dehnungsformen wurden in jeweils einem Experiment mit demselben Faserbündel untersucht. Es wurden keine unterschiedlichen Wirkungen auf die Einbau-Rate festgestellt. Bei beiden Dehnungsarten wurde die Einbau-Rate in gleichen Maß gegenüber dem Ruhe-Wert erhöht (Tab. 3).

Die ATPase-Aktivität wird in der Literatur teils mit der Arbeit pro Zyklus (Pybus and Tregear, 1972; White and Thorson, 1973), teils mit der Leistung (=Arbeit x Frequenz) in Korrelation gesetzt (Steiger, 1969; Steiger und Rüegg, 1969). In Abb. 35 wurden neben der Einbau-Rate beide Größen - Arbeit und Leistung - in Abhängigkeit von der Frequenz aufgetragen.

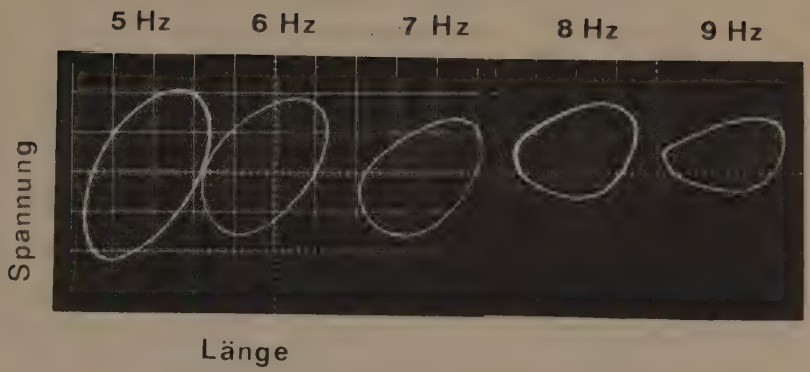


Abb. 34: Längen-Spannungsdiagramme bei sinusförmigen Dehnungen (Amplitude: 1 % L_o).
Die von der Lissajous-Figur eingeschlossene Fläche entspricht der von den Muskelfasern geleisteten Arbeit. Wird die Figur gegen den Uhrzeigersinn durchlaufen, ist die Arbeit positiv, da die Spannung bei Entdehnung größer ist als bei Dehnung. Negative Arbeit liegt vor, wenn die Figur im Uhrzeigersinn durchlaufen wird. Wie die Abb. zeigt, ist die Arbeit von der Frequenz abhängig.

Tab. 3: Vergleich der Wirkung von sinusförmigen und rechteckförmigen Dehnungszyklen auf die Einbau-Reaktion. Frequenz: 4 Hz, Amplitude: 1 % L_o

Relative Aktivierung (Ruhe = 100 %)

Expt.	Dehnungsform			
1	176 %	185%	171 %	170 %
2	194 %	216 %	178 %	193 %
3	140 %	143 %		

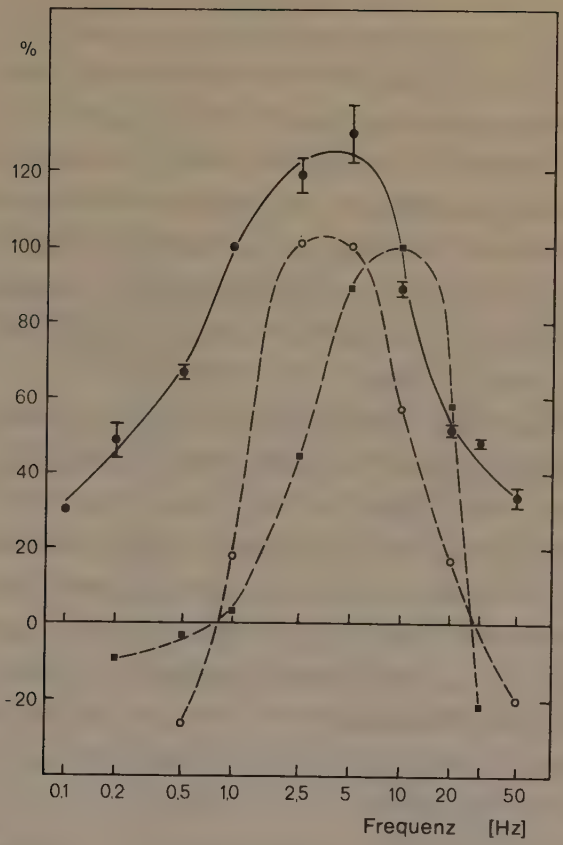


Abb. 35: Die Abhängigkeit der dehnungsinduzierten Einbau-Rate (●——●), der Arbeit (o---o) und der Leistung (■---■) von der Frequenz sinusförmiger Dehnungen (Amplitude: 1 % L_o). Einbau-Rate in % des Referenzwerts 1 Hz (= 100 %), Arbeit und Leistung in % des jeweiligen Maximalwerts.

Offenbar besteht eher eine Korrelation der Einbau-Rate mit der Arbeit pro Zyklus als mit der Leistung. Eine relativ gute Übereinstimmung herrscht im Frequenzbereich um 5 Hz, der die Optima sowohl für die Einbau-Reaktion als auch für die Arbeit einschließt. Bei höheren und niedrigeren Frequenzen sind die Abweichungen aber sehr groß. Während die Arbeit bei Frequenzen unter 1 Hz und über 30 Hz schon im negativen Bereich liegt, ist die Einbau-Rate gegenüber den Ruhe-Werten noch deutlich erhöht.

An dieser Stelle läßt sich das früher angeschnittene Problem klären, ob eine mit negativer Arbeit korrelierte Umkehr der ATP-Spaltung möglich ist (vgl. Einl.). Die in Abb. 35 dargestellten Ergebnisse bestätigen zwar die früheren Befunde, wonach bei negativer Arbeit die Einbau-Rate höher ist als bei isometrischer Kontraktion (Mannherz, 1970). Aber die Untersuchung eines großen Frequenzbereichs zeigt nun, daß die Aktivierung der Einbau-Reaktion bei positiver Arbeit noch bedeutend höher ist. Mit negativer Arbeit besteht dagegen eher eine negative Korrelation.

Die Kurve für die Frequenzabhängigkeit sinusförmiger Dehnungszyklen unterscheidet sich so gut wie gar nicht von der in Abb. 30 dargestellten Kurve für rechteckförmige Dehnungszyklen. Die Annahme ist daher berechtigt, daß die Frequenzeffekte bei sinusförmigen Dehnungen in gleicher Art durch die Kinetik der chemomechanischen Prozesse (s. voriges Kapitel) bedingt sind. Die Korrelation mit der Arbeit im optimalen Frequenzbereich dürfte eher eine indirekte Folge sein.

11. Die Untersuchung der statischen Dehnung

Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die dehnungsinduzierte Einbau-Reaktion in erste Linie von der schnellen Anfangsphase der dynamischen Spannungsentwicklung abhängt, also nicht von statischer Spannung bei langandauernder Dehnung. Um dies sicherzustellen, wurden noch einige Versuche mit statischer Dehnung durchgeführt. Abb. 36 zeigt als Beispiel einen Versuch, bei dem zum Vergleich auch Rechteckdehnungen (1 Hz) mituntersucht wurden. Während bei den repetitiven Dehnungszyklen wie in den übrigen Untersuchungen ein deutlicher Aktivierungseffekt auftrat, wurde durch statische Dehnung die Einbau-Rate nicht erhöht.
Andererseits wurde aber auch in einem Versuch mit Entdehnung um 4 % oder 8 % der Ruhelänge (wodurch die statische Spannung herabgesetzt, aber nicht vernichtet wurde), auch keine Erniedrigung der Einbau-Rate festgestellt.
Die Einbau-Rate wird offenbar nicht durch Änderungen der statischen Spannung beeinflußt, wenn diese Änderungen nur durch mechanische Mittel: Dehnung und Entdehnung um einige % der Ruhelänge, bewirkt werden. Durch solche geringen Längenänderungen wird der Überlappungsgrad der Filamente natürlich kaum geändert. Außerdem ist darauf hinzuweisen, daß bei längeren Inkubationszeiten die Spannung nach Dehnung bzw. Entdehnung wieder auf den Ausgangswert zu strebt.
Es ist jedoch daran zu erinnern, daß Änderungen der Spannung durch Änderung der Ca^{2+}-Konzentration einen großen Effekt

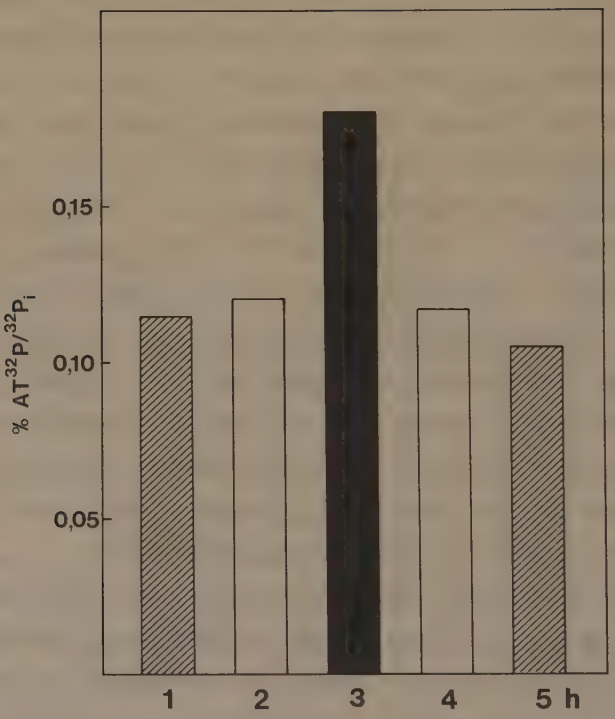


Abb. 36: Wirkung von statischer und dynamischer Dehnung auf die Einbau-Rate. Fünf aufeinanderfolgende Inkubationsperioden eines Faserbündels von je 1 h. □ Ruhelänge (L_o), ▨ Dehnung um 1,5 % L_o, statisch, ■ repetitive ⎍⎍⎍-Dehnungen um 1,5 % L_o (1 Hz).

auf die Einbau-Rate haben. Auch andere chemische Agenzien, die die Spannung herabsetzen, erniedrigen im gleichen Maß die Einbau-Rate, wie sich in den Kontrollversuchen mit Prenylamin und Äthanol/Oligomycin herausgestellt hat.

12. Vergleich von Entdehnungs- und Dehnungszyklen:

Daß Änderungen der statischen Spannung durch Längenänderungen keine Wirkung haben, stellte sich auch in einer anderen Versuchs-Reihe heraus, in der Entdehnungszyklen mit Dehnungszyklen verglichen wurden. Auch bei Entdehnungszyklen tritt der verzögerte Spannungsanstieg auf, durch den in diesem Fall wieder die Ruhe-Spannung erreicht wird. Die durchschnittliche Gesamt-Spannung ist aber niedriger als bei ungedehnten Fasern. Wie Tab. 4 zeigt, haben Entdehnungszyklen die gleiche Erhöhung der Einbau-Rate zur Folge wie Dehnungszyklen.
Für den Aktivierungseffekt ist also allein der dynamische Spannungsanstieg verantwortlich.
In diesem Punkt unterscheidet sich die Einbau-Reaktion von der ATPase-Aktivität, die durch statische Dehnung um einige % L_o noch erhöht werden kann, wenn auch nicht in dem Maß wie durch dynamische Dehnung (Rüegg and Tregear, 1966; Rüegg and Stumpf, 1969).

Tab. 4: Vergleich der Wirkung von Dehnungs- (⎍) und Entdehnungszyklen (⎍) auf die Einbau-Rate. Frequenz: 1 Hz, Amplitude: 1 % L_o

Einbau-Rate: % ATP/P_i pro Faserbündel in 1 h

Experiment* Nr.	1	2	3
Ruhe	0,165	0,086	--
Dehnung	0,229	0,146	0,151
Ruhe	0,126	0,075	0,102
Entdehnung	0,249	0,145	0,220
Ruhe	0,132	0,075	0,115
Dehnung	0,226	0,126	0,201
Ruhe	--	0,071	0,098
Entdehnung	--	0,121	0,145

*Jede senkrechte Reihe repräsentiert ein Experiment mit einem einzigen Faserbündel.

13. Die mechanische Aktivierung - ein Artefakt?

Die Erhöhung der Einbau-Rate durch mechanische Effekte könnte vielleicht als Artefakt angesehen werden. Da die Aktivierung nur durch dynamische, nicht durch statische Spannungsänderungen bewirkt wird, wäre an eine Art Rühreffekt und dadurch verbesserte Diffusion zu denken. Dies ist aber aus verschiedenen Gründen sehr unwahrscheinlich:

1.) Die Bewegung der Fasern bei den repetitiven Dehnungszyklen erfolgt um einen sehr geringen Betrag. 1 % der Faserlänge entspricht 0,05 mm. Dies dürfte bei einem Lösungsvolumen von 0,3 cm^3 kaum einen Rühreffekt zur Folge haben.

2.) Die Untersuchung verschiedener ATP-Konzentrationen hat ergeben, daß die optimale ATP-Konzentration für gedehnte und ungedehnte Fasern im gleichen Bereich liegt, wobei die absoluten Einbau-Raten für gedehnte Fasern (1 Hz und 10 Hz) bei jeder Konzentration deutlich über den Raten für ungedehnte Fasern liegen und keine Überschneidung bei hohen ATP-Konzentrationen auftritt. Der mechanische Aktivierungseffekt ist also nicht auf verbesserte ATP-Diffusion infolge Bewegung der Fasern zurückzuführen. Dies dürfte für Phosphat - ein kleineres Molekül - erst recht zutreffen.

3.) Frequenzeffekte: Bei höheren Frequenzen von mehr als 5 Hz nahm die Aktivierung wieder ab, was für einen Rühreffekt ziemlich merkwürdig wäre. Der Vergleich mit der Abhängigkeit der Aktivierung von der Dehnungszeit hat aber gezeigt, daß

sich auch in den Frequenzeffekten die Kinetik von Spannung und Einbau-Reaktion widerspiegelt. Die Wirkungen zweier so verschiedener Parameter wie Dehnungszeit und Frequenz konnte also auf die gleiche Ursache zurückgeführt werden. Von einem Artefakt wäre dies nicht zu erwarten.

IV. DISKUSSION

1. Wird die Incorporation von $^{32}P_i$ in ATP durch Actomyosin katalysiert?

Die beschriebenen Untersuchungen zeigen, daß die Einbau-Reaktion von P_i in ATP bei glycerinextrahierten Muskelfasern durch das Actomyosin selbst katalysiert wird und nicht länger als Artefakt angesehen werden kann.
Die Reaktion wurde durch Inhibitoren der Glycolyse, der Mitochondrien und des sarcoplasmatischen Reticulums nicht gehemmt. Sie wurde aber in gleicher Weise durch Ca^{++}-Ionen aktiviert wie ATPase und Spannung. Außerdem besteht die gleiche Abhängigkeit von der Temperatur (Q_{10} = 4) wie bei ATPase und der Kinetik der dehnungsaktivierten Spannung.
Daß in den früheren Versuchen (vgl. Einl.) keine Incorporation von $^{32}P_i$ in ATP nachgewiesen werden konnte (Koshland et al., 1954; Ulbrecht und Ulbrecht, 1957; Dempsey et al., 1963), ist nicht erstaunlich, da nur etwa 0,1 % des P_i in ATP eingebaut wird. Dies erfordert empfindliche Nachweismethoden und eine sehr gute Trennung von ATP und P_i
Inzwischen wurde auch bei Homogenaten (Myofibrillen) und isolierten Proteinen (Actin und Myosin) der Einbau von $^{32}P_i$ in ATP nachgewiesen (Hotta and Fujita, 1971; Paulsen, in Vorb., Ulbrich und Paulsen, 1973; Wolcott and Boyer, 1974).
Ein neuerdings unternommener Versuch, aufgrund von negativen Versuchsergebnissen zu zeigen, daß Actomyosin diese Einbau-

Reaktion nicht katalysiert (Inoue, 1973), ist jedoch nicht beweiskräftig. Die in diesen Versuchen angewandte Methodik erscheint nicht geeignet, Einbau-Raten von 0,1 % (oder weniger) nachzuweisen (vgl. Wolcott and Boyer, 1974).

2. Die Abhängigkeit der Einbau-Reaktion von mechanischen Faktoren:

Die Untersuchungen der Reaktion unter verschiedenen mechanischen Bedingungen haben gezeigt, daß keine Abhängigkeit von negativer Arbeit besteht. Dagegen ließ sich eine gute Korrelation mit der dynamischen Spannungsentwicklung nachweisen. Durch Erhöhung der Dehnungsamplitude (bei rechteckförmigen Dehnungszyklen) wird die Einbau-Rate proportional zur Spannung und ATPase-Aktivität erhöht. Bemerkenswert dabei ist, daß der größte Zuwachs bis etwa 1 % L_o erreicht wird. (Das entspricht etwa einer Ruderbewegung der Querbrücken.) Die Abhängigkeit von der Dehnungsdauer pro Zyklus hat gezeigt, daß die Reaktion eng mit der Kinetik der Spannungsentwicklung, die nach Längensprüngen sichtbar wird, korreliert ist. Dagegen ist ein statischer Effekt nur schwach ausgeprägt, und dementsprechend konnte keine Erhöhung der Einbau-Rate durch statische Dehnung erreicht werden.

Die Korrelation mit der Kinetik der Spannungsentwicklung wurde auf andere Art auch durch die Frequenzeffekte (bei rechteckförmigen Dehnungen) bestätigt: Die geringere Aktivierung der Einbau-Rate bei hohen Frequenzen (10 Hz bis 60 Hz) ist mit der Abnahme der maximal erreichbaren

Spannung korreliert (Folge kurzer Dehnungsdauer).
Bei niedrigeren Frequenzen unter 5 Hz mit entsprechend längeren Dehnungszeiten wird dagegen die maximale Spannung erreicht, ebenso die statische Phase der Einbau-Reaktion. Daher nimmt die Einbau-Rate hier mit der Frequenz zu. Im mittleren Frequenzbereich um 5 Hz überlappen sich beide Komponenten.
Bei sinusförmigen Dehnungen besteht die gleiche Abhängigkeit von der Frequenz. Daraus ist zu schließen, daß hier dieselben Parameter verantwortlich sind wie bei rechteckförmigen Dehnungen. Eine Proportionalität mit der (positiven) Arbeit in einem gewissen Frequenzbereich dürfte dagegen eher eine indirekte Folge sein. Es besteht also primär ein Parallelismus zwischen Einbau-Reaktion und dynamischer Spannung. Dagegen ist die Proportionalität mit der Arbeit als einer von der Spannung abgeleiteten Größe nicht über alle Frequenzbereiche gleichermaßen ausgeprägt, sondern am deutlichsten im optimalen Frequenzbereich um 5 Hz.
Die ersten bei Insektenmuskeln erhaltenen Befunde, wonach die Einbau-Rate durch sinusförmige, negative Arbeit zuführende Dehnungszyklen gegenüber isometrischer Kontraktion erhöht wurde (Mannherz, 1970), sind demnach durch die Erhöhung der dynamischen Spannung zu erklären.
Die von Gillis und Maréchal (1974) an Skelettmuskeln von Kaninchen erhaltenen Ergebnisse zeigen ebenfalls eine Korrelation zwischen Einbau-Rate und Spannung, nicht mit der negativen Arbeit. Das ist um so bemerkenswerter, als hier

mit völlig anderer Versuchsanordnung und Methodik gearbeitet wurde. Es spricht bis jetzt also nichts dafür, daß im Muskel eine Umkehr der chemomechanischen Prozesse, etwa in Analogie zur Umkehr der Ionen-Pumpen, stattfindet.
Die Einbau-Reaktion ist offensichtlich an das Ablaufen der Vorwärtsreaktion, der ATP-Spaltung gebunden. Dazu paßt auch, außer der Abhängigkeit von der Ca^{++}-Konzentration und der Spannung, die starke Abhängigkeit der Einbau-Rate von der ATP-Konzentration, während die ADP-Konzentration keine Rolle spielte. (Daher erklärt es sich wohl teilweise, daß in den beschriebenen Versuchen die Einbau-Rate bedeutend höher war als bei den früheren Versuchen von Mannherz (1970), die mit niedriger ATP-Konzentration und relativ hohen ADP-Konzentrationen durchgeführt wurden.)

3. Bedeutung der Einbau-Reaktion für den Reaktionsmechanismus der Actomyosin-ATPase:

Der Einbau von $^{32}P_i$ in ATP bedeutet, daß die ATP-Spaltung reversibel ist, wahrscheinlich auf einer intermediären Stufe, wie die Abhängigkeit von der Vorwärtsreaktion vermuten läßt. Als Intermediat ist ein Enzym-ADP-Komplex zu postulieren, der mit freiem anorg. Phosphat unter Bildung von ATP reagieren kann. In erster Näherung kann folgender Reaktionsmechanismus formuliert werden:

$$E + ATP \longleftrightarrow E \cdot ATP \longleftrightarrow E \cdot ADP + P_i \longleftrightarrow E + ADP + P_i$$

Dabei ist noch offen, ob unter "E" Actomyosin oder Myosin zu verstehen ist.

Dieser Mechanismus steht in Gegensatz zu den älteren Hypothesen, die phosphoryliertes Myosin als intermediäre Stufe bei der ATP-Spaltung annahmen (s. Einl.). Diese Vorstellungen können heute aufgegeben werden, wie später im Zusammenhang mit neueren kinetischen Untersuchungen gezeigt werden wird. Übrigens konnte auch in einer neueren Untersuchung keine ADP-ATP-Austausch-Reaktion nachgewiesen werden, die ja bei der Existenz eines E~P-Intermediats zu erwarten wäre (Ikezawa et al., 1971).

Im Zusammenhang mit der Reversibilität der ATP-Spaltung sei an die ^{18}O-Austauschversuche erinnert, die ja in der Absicht durchgeführt wurden, den Mechanismus der ATPase aufzuklären, aber aus den schon genannten Gründen (s. Einl.) nicht interpretiert werden konnten. Der ^{18}O-Austausch ist zwar grundsätzlich mit der Reversibilität der ATP-Spaltung zu vereinbaren. Andererseits, für sich allein genommen, spricht er auch nicht zwingend für eine Reversibilität, da die austauschbaren O-Atome nur indirekt am Zustandekommen der Anhydrid-Bindung beteiligt sind. Die ^{18}O-Austausch-Reaktionen lassen sich wohl noch besser durch einen Additions-Eliminierungsmechanismus von H_2O erklären, wobei ein penta-koordiniertes Intermediat entsteht. Eine Hydrolyse braucht hierbei nicht stattzufinden (Korman and McLick, 1973; Young et al., 1974). Mit einem solchen Mechanismus wäre auch eher die Tatsache zu erklären, daß keine enge Korrelation zwischen Austausch-Rate und Hydrolyse bestand und daß der "Medium"-Austausch nur an die Anwesenheit von Nucleotiden (auch Mono- oder Triphos-

phate), aber nicht an die ATP-Spaltung gebunden war. Im Gegensatz zu der $^{32}P_i$ - Einbau-Reaktion wurde die Rate der ^{18}O-Austausch-Reaktion durch Actin herabgesetzt. Es ist also nicht wahrscheinlich, daß die beiden Austausch-Reaktionen auf derselben intermediären Stufe stattfinden. Die $^{32}P_i$-Einbau-Reaktion liefert bezüglich der Reversibilität das eindeutigere Ergebnis.

4. Vergleich mit kinetischen Untersuchungen an isolierten Muskelproteinen:

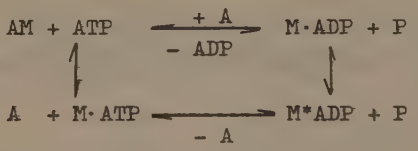
Wieweit stimmen nun die beschriebenen, an funktionsfähigen Muskelfasern erhaltenen Ergebnisse mit den Ergebnissen biochemischer Untersuchungen an isolierten Muskelproteinen überein? Nach kinetischen Untersuchungen kann heute das Auftreten eines oder mehrerer Myosin-ADP-Intermediate als gesichert gelten. An erster Stelle sind hier die Untersuchungen von Taylor und Mitarbeitern zu nennen, die entscheidend zum Verständnis des ATPase-Mechanismus der Muskelproteine beigetragen haben und viele weiterführende Untersuchungen angeregt haben (Taylor, Lymn and Moll,1970; Lymn and Taylor, 1970, 1971). Der große Fortschritt liegt vor allem in dem Befund, daß der Hydrolyse-Schritt selbst nicht an die Myosin-Actin-Interaktion gebunden ist, sondern nach der sehr schnellen Dissoziation des Actomyosins ($k > 1000\ sec^{-1}$) durch ATP am Myosin allein erfolgt. (Diese Tatsache ist sowohl für die Korrelation mit mechanischen Prozessen als auch für energetische Überlegungen von großer Bedeutung.)

Nach der ebenfalls raschen ATP-Spaltung (k = 100 bis 150 sec^{-1}) entsteht ein langlebiger nicht-kovalenter Myosin-Produkt-Komplex, dessen Zerfall als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt angesehen wird. Auf der Beschleunigung dieses geschwindigkeitsbestimmenden Schritts beruht nach Taylor die aktivierende Wirkung des Actins.
Das Taylor-Schema sieht also für die Actomyosin-ATPase bzw. Myosin-ATPase folgende Schritte vor:(Lymn and Taylor, 1971):

$$\begin{array}{ccccccc} AM + ATP & \longleftrightarrow & AM\cdot ATP & & AM\cdot ADP\,P & \longleftrightarrow & AM + ADP + P \\ & & \updownarrow -A & & \updownarrow +A & & \\ M + ATP & \longleftrightarrow & M\cdot ATP & \longleftrightarrow & M\cdot ADP\cdot P & \longleftrightarrow & M + ADP + P \end{array}$$

(A = Actin, M = Myosin)
Der M·ADP·P-Komplex entspricht hier einem einfachen Michaelis-Menten-Komplex, P_i dissoziiert wahrscheinlich schneller ab als ADP.
Unsere Ergebnisse sind mit einem solchen Mechanismus grundsätzlich vereinbar. Bedenkt man aber, unter welchen Versuchsbedingungen die Einbau-Rate erhöht wird, so zeigen sich Widersprüche. Nach dem Taylor-Schema muß bei Hemmung der Myosin-Actin-Wechselwirkung der M·ADP-Komplex vorherrschen. (Es wurde auch gefunden, daß in glycerin-extrahierten Muskelfasern unter den gebundenen Nucleotiden ADP überwiegt; Marston, 1973.) Wäre der für die $^{32}P_i$-Einbau-Reaktion verantwortliche Komplex mit dem Taylor'schen Myosin-Produkt-Komplex identisch, so wäre bei geringerer Myosin-Actin-Interaktion eine höhere Einbau-Rate zu erwarten, weil dann die Wahrscheinlichkeit für eine Reaktion mit P_i größer wäre.

Tatsächlich wird aber die Einbau-Rate parallel zur Myosin-Actin-Interaktion (Spannung, ATPase!) erhöht. Es sieht also so aus, als wäre die Rückreaktion nur während einer beschränkten Zeitspanne im Verlauf eines ATPase-Zyklus möglich. Daraus folgt, daß dem einfachen Myosin-Produkt-Komplex noch mindestens ein anderer intermediärer Komplex vorausgeht.
Das Taylor-Schema ist also zu modifizieren:



Auch für die Myosin-ATPase in vitro gibt es experimentelle Hinweise auf intermediäre ADP-Komplexe, die sich vom Michaelis-Menten-Komplex unterscheiden: Verschiedene spektroskopische Untersuchungen (UV-Absorption, Fluoreszenz, Elektronen-Spin-Resonanz) zeigten, daß außer dem M·ATP-Komplex und dem M·ADP-Komplex ein weiterer M·ADP-Komplex vorhanden sein muß, der nur unmittelbar nach vorangegangener ATP-Spaltung auftritt und nicht durch Bindung von ADP an Myosin gebildet werden kann (Morita, 1967; Seidel and Gergely, 1971, 1973; Werber et al., 1972).
Nach Trentham und Mitarb. ist die Umwandlung eines intermedidiären M*ADP-Komplexes in den einfachen Michaelis-Menten-Komplex der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, und nicht die Produkt-Freisetzung (Trentham et al., 1972; Bagshaw and Trentham, 1973). Dementsprechend müßte Actin an diesem Schritt beteiligt sein, um die Aktivierung der ATPase zu

bewirken. Grundsätzlich passen die bei glycerinextrahierten Muskelfasern erhaltenen Ergebnisse der $^{32}P_i$-Einbau-Reaktion zu den enzymkinetischen Befunden. Es dürfte allerdings nicht sinnvoll sein zu versuchen, das für die Einbau-Reaktion verantwortliche Intermediat mit einem aus den neueren kinetischen Schemata (Bagshaw and Trentham, 1973) zu identifizieren. Diese sind durch ihr spektrales Verhalten charakterisiert. Es ist auch anzunehmen, daß mit der Verfeinerung der Methoden noch weitere Zwischenstufen gefunden werden.

Ein Punkt ist noch hervorzuheben und zwar die Rolle des abgespaltenen Phosphats. Im ursprünglichen Taylor-Schema findet die Dissoziation des P_i fast gleichzeitig mit der des ADP statt. Auch in den neueren Schemata wird die Abdissoziation des P_i relativ spät angesetzt. Die P_i-Incorporation läßt jedoch darauf schließen, daß sich P_i in seinem Dissoziationsverhalten wesentlich vom ADP unterscheidet (was auch aufgrund der sehr verschiedenen molekularen Struktur zu erwarten ist). Das P_i muß zumindest so locker gebunden sein, daß es leicht mit freiem P_i aus der Lösung austauschen kann.

Der für die Einbau-Reaktion veranwortliche Komplex müßte noch vor dem auftreten, dessen Umwandlung geschwindigkeitsbestimmend ist. Sonst sollte Actin nicht aktivierend auf die Einbau-Rate wirken, da es für die Entfernung des sich langsam umwandelnden Intermediats sorgt.

5. Energetische Betrachtungen:

Die Einbau-Rate beträgt ca. 0,1 % $AT^{32}P/^{32}P_i$ pro Faserbündel in 1 h. Daraus ergibt sich als absolute Einbau-Rate - eine Phosphatkonzentration von ca. 5 mM im Faserbündel angenommen - 8 pMol/ cm Faser x Min. Das entspricht ca. 1,3 % der durchschnittlichen ATPase-Aktivität von 600 pMol P_i/cm Faser x Min. Das Verhältnis von Vorwärtsreaktion zu Rückreaktion ist also etwa 100 : 1. Daraus läßt sich eine Abnahme der freien Energie von etwa 2,7 Kcal/Mol (für Standardbedingungen) abschätzen. Nun ist aber zu berücksichtigen, daß die gefundenen Einbau-Raten Minimalwerte sind. Die tatsächliche Rate der Rückreaktion dürfte aus verschiedenen Gründen noch weit höher sein. So ist anzunehmen, daß ein großer Teil des gebildeten ^{32}P-ATP gespalten wird, bevor es sich mit ATP aus dem Medium ins Gleichgewicht setzen kann. Außerdem muß sich das ^{32}P-ATP vom Enzym lösen, um nachgewiesen werden zu können. (Hierbei spielt auch die Wechselwirkung mit Actin eine Rolle.) Es ist daher wahrscheinlich, daß die wirkliche Rate der Rückreaktion 1/9 der Vorwärtsreaktion beträgt, wie für das System M·ATP ⟶ M*ADP·P gefunden wurde (Bagshaw und Trentham, 1973). Die Energieabnahme beträgt in diesem Fall nur 1,2 Kcal/Mol.

Ist es nun berechtigt, da die Energie des ATP beim hydrolytischen Schritt nicht sehr viel abnimmt, von einem "energiereichen" M*ADP-Komplex zu sprechen? Zunächst ist auf den Begriff der "energiereichen" Bindung näher einzugehen.

In der Biochemie wurde der Begriff für verschiedene organische Phosphatester eingeführt, die ein hohes Gruppenübertragungspotential haben, also eine Phosphorylgruppe leicht auf Wasser oder andere Moleküle übertragen. Dabei wird ein gewisser Energiebetrag freigesetzt, im Fall der Hydrolyse definitionsgemäß mindestens 6 Kcal/Mol. Die "energiereiche" Bindung ist praktisch gleichbedeutend mit der reaktionsfähigen Bindung im Sinn der organischen Chemie. Reaktionsfähige Bindungen sind polarisiert, d. h. sie haben eine unsymmetrische Elektronendichte. Das führt zu einer Labilität des Moleküls und infolgedessen zur Tendenz, durch Reaktion mit anderen Molekülen, evtl. durch Abgabe einer Gruppe, zu energetisch günstigerer Elektronenverteilung zu gelangen.
ATP ist ein Molekül mit ausgeprägt polarisierten Bindungen bzw. ungleicher Ladungsverteilung, daher die Tendenz, Phosphatgruppen abzugeben (Pullman und Pullman, 1967; cf. Metzner, 1971). Der "Energiereichtum" des ATP beruht zur Hälfte auf seiner ungewöhnlichen Ladungsverteilung (Pullman und Pullman, 1967). Eine Stabilisierung des Moleküls, d. h. eine Abnahme der Energie, kann aber wohl auch durch andere Mittel als durch die Abgabe von Phosphatgruppen erreicht werden. Die Ladungsverteilung könnte z. T. durch nichtkovalente Bindung an ein anderes Molekül mit passenden Gruppen ausgeglichen werden. Das ist gerade im Fall von ATP und Myosin denkbar. Myosin ist für die große Zahl von geladenen Aminosäureresten bekannt (Perry, 1967; Bendall, 1969).

Um auf den Ausgangspunkt zurückzukommen: Der Befund, daß ein Myosin-ADP-Intermediat zur Rückbildung von ATP fähig ist, muß nicht in dem Sinn interpretiert werden, daß eine "energiereiche" Verbindung vorliegt. Vielmehr könnte ATP schon einen großen Teil seiner Energie durch die Bindung an Myosin abgegeben haben. Dafür spricht auch die Tatsache, daß die Bindung von ATP an Myosin sehr schnell erfolgt ($k = 2 \times 10^6$ $M^{-1}sec^{-1}$ nach Lymn und Taylor, 1971). Die Rückreaktion fände dann also statt, weil M·ATP nicht mehr viel energiereicher ist als M*ADP. Das schließt allerdings nicht aus, daß beim Übergang in den einfachen M·ADP-Komplex noch eine weitere Energieabnahme erfolgen kann.

6. Sind die Reaktionen von isolierten Proteinen und intakten Muskelfasern vergleichbar?

Es wird oft bezweifelt, daß die enzymatischen Eigenschaften der Muskelproteine in vitro auf die Verhältnisse im intakten Muskel übertragbar sind. Das Hauptargument ist, daß im Muskel die Querbrücken unter mechanischer Spannung stehen; auch sind die wahren Konzentrationen der beteiligten Ionen nicht bekannt. Was den hydrolytischen Schritt selbst betrifft, so sollten allerdings keine Unterschiede zu erwarten sein, da dieser Schritt am Myosin allein, nach Ablösung vom Actin, stattfindet und mechanische Faktoren daher keine Rolle spielen können. An den darauffolgenden Schritten, der Umwandlung des M*ADP-Komplexes in den einfachen Michaelis-Menten-Komplex und der Freisetzung des ADP, ist Actin beteiligt, und da dies wahrscheinlich mit der Spannungsentwicklung gekoppelt ist, könnten hier mechanische Faktoren evtl. eingreifen.
Die Ergebnisse der mechanischen Untersuchungen, vor allem der Abhängigkeit der Einbau-Reaktion (sehr wahrscheinlich auch der ATPase) von der Dehnungszeit, weisen aber darauf hin, daß zumindest die Gesamtkinetik in Muskelfasern mit der in vitro (bei Actomyosin) vergleichbar ist. Die Methode der raschen Längenänderungen ermöglicht es, die Anfangskinetik der mechanischen und enzymatischen Reaktionen zu verfolgen analog zu "stopped flow"-Experimenten in vitro. Der Start der Reaktion erfolgt bei Fasern durch mechanische Störung eines Gleichgewichts, während die Reaktion in vitro

durch rasches Mischen der Reaktionspartner gestartet wird. Tatsächlich hat die Kinetik der Einbau-Reaktion - gemessen als Funktion der Dehnungszeit - auffallende Ähnlichkeit mit der der Actomyosin-ATPase in Lösung (cf. Fig. 1 bei Lymn und Taylor, 1971). Dazu kommt noch die enge Korrelation mit der Spannungskinetik. Es besteht hier allerdings das Problem, daß für die Versuche mit glycerinierten Fasern Insektenmuskeln verwendet wurden, während rein biochemische Untersuchungen i. a. mit Skelettmuskeln von Kaninchen durchgeführt werden. Die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften der Skelettmuskeln, die unter geeigneten Bedingungen ebenfalls das Phänomen der Dehnungsaktivierung zeigen, hat aber ergeben, daß ihre Spannungskinetik (zufällig) gut mit der von Insektenflugmuskeln (Lethocerus maximus) übereinstimmt (Rüegg et al., 1970; Steiger, 1971). Auch die Enzymaktivitäten beider Muskelarten in Lösung zeigen keine wesentlichen Unterschiede (Bullard et al., 1973). Es spricht also einiges dafür, daß die Gesamtkinetik in funktionierenden Muskelfasern nicht wesentlich anders ist als bei isoliertem Actomyosin.

7. Koppelung zwischen chemischen und mechanischen Prozessen - Energietransformation:

Nach den heutigen Befunden ist die ATP-Spaltung selbst nicht mit der Krafterzeugung verknüpft, die ja an die Wechselwirkung von Myosin und Actin gebunden sein muß. Die ATP-Spaltung ist mit relativ geringer Energieabgabe verbunden. Dies erscheint sinnvoll, wenn mit der ATP-Spaltung kein mechanischer Prozeß - sei es Dissoziation oder Assoziation von Actin und Myosin - gekoppelt ist. In diesem Zusammenhang ist wohl auch der Befund zu sehen, daß die Rückreaktion (^{32}P-Incorporation) offensichtlich nicht von der Zuführung äußerer Arbeit abhängig ist. Als energieabhängiger Vorgang kommt vor allem die Dissoziation von Actin und Myosin in Frage. Nach Wolcott und Boyer (1974) beträgt die Energieabnahme bei der Bindung von ATP an Myosin 12,7 Kcal/Mol. (Im Actomyosinsystem dürfte der Betrag geringer sein.) Daß eine Energieabnahme nicht unbedingt mit der Übertragung einer Phosphorylgruppe verbunden sein muß, wurde schon zu erklären versucht (s. S. 123).
Die ATP-Spaltung scheint vor allem deshalb nötig zu sein, um das Nucleotid zu entfernen und so den Beginn eines neuen Querbrückenzyklus zuzulassen.
Wenn die Umwandlung eines langsam dissoziierenden M*ADP-Komplexes in den einfachen Myosin-Produkt-Komplex der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist und dieser durch Actin beschleunigt wird, liegt es nahe, diesen Schritt im mechanischen Bereich mit dem spannungserzeugenden Schritt gleichzusetzen.

Zur Wechselwirkung zwischen Myosin, Actin, ATP und ADP:

Wie schon wiederholt festgestellt wurde, bewirkt ATP durch Bindung an Myosin die Dissoziation des Actomyosin-Komplexes- Umgekehrt wird die Bindung von ATP an Myosin durch Zugabe von Actin geschwächt. In Actomyosin-Lösung ist nach Wolcott und Boyer (1974) durch Incorporation von $^{32}P_i$ gebildetes ^{32}P-ATP im Gleichgewicht mit freiem ATP der Lösung. Das ist bei Myosin allein nicht der Fall.
Das Entsprechende gilt für Myosin-ADP und Actin. Denn eine starke Bindung des Substrats bedingt eine langsame Dissoziation des strukturell ähnlichen Produkts (Dixon and Webb, 1964). Ein Modifikator, der die Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes fördert, wird im gleichen Sinn auf die Dissoziation des Enzym-Produkt-Komplexes wirken. Genau diese Verhältnisse treffen auch für das Myosin-Actin-Nucleotid-System zu.
Wenn es verschiedene Myosin-ADP-Komplexe gibt, ist es wahrscheinlicher, daß Actin auf einen M*ADP-Komplex einwirkt als auf den einfachen Michaelis-Menten-Komplex, da ersterer dem Myosin-ATP-Komplex ähnlicher sein dürfte.
Es ist anzunehmen, daß die Affinität des Myosins zu Actin desto größer wird, je weiter die Umwandlung des M*ADP-Komplexes fortschreitet. Im mechanischen Bereich entspräche dies dem spannungserzeugenden Übergang der Querbrücke aus der 90^0-Stellung in die 45^0-Stellung.

Setzt man die heute bekannten Ergebnisse biochemischer und mechanischer Untersuchungen zusammen, so zeichnet sich folgendes Bild der chemomechanischen Energietransformation ab: Zu Beginn des Querbrückenzyklus bilden Actin und Myosin durch Protein-Protein-Interaktion einen festen Komplex. Die Querbrücke liegt in der 45°-Stellung vor. Um den Actomyosin-Komplex zur Dissoziation zu bringen, ist Energiezufuhr nötig. Diese kann duch ATP geliefert werden, das sich als "energiereiches" Molekül durch stark polarisierte Bindungen bzw. eine ungewöhnliche Ladungsverteilung auszeichnet. Diese Ladungsverteilung kann wahrscheinlich durch Wechselwirkung mit entsprechenden Gruppen des Myosins teilweise ausgeglichen werden. ATP gibt also schon durch die Bindung an Myosin Energie ab, bevor ATP-Spaltung stattfindet. Durch die Bindung von ATP an Myosin wird, vermutlich durch einen allosterischen Effekt, die Affinität des Myosins zu Actin herabgesetzt und es kommt zur Dissoziation des Actomyosins. Von Actin "befreit" kann Myosin eine andere Konformation annehmen, die 90°-Stellung der Querbrücke. (Auf den Übergang in die 90°-Stellung schon vor der ATP-Spaltung weisen Untersuchungen der Röntgenbeugungsmuster von Insektenflugmuskeln in Gegenwart von nicht hydrolysierbaren ATP-Analogen hin. Barrington-Leigh et al., 1972.) Damit Myosin sich erneut an Actin anheften und den Zyklus vollenden kann, muß ATP entfernt werden. Dies geschieht unter physiologischen Bedingungen durch ATP-Spaltung. Im Experiment kann ATP bzw. nicht spaltbares ATP-Analog durch Auswaschen entfernt werden. So können ebenfalls mit mechanischer Leistung

verbundene Querbrückenzyklen - ohne ATP-Spaltung - erzeugt werden (Kuhn et al., 1972; Kuhn, 1973).
Nach der ATP-Spaltung, die reversibel ist, kommt es wieder zur Wechselwirkung mit Actin, wobei die Hydrolyse-Produkte entfernt werden und die Querbrücke wieder in die 45°-Stellung übergeht. Dieser Schritt ist mit der mechanischen Krafterzeugung verbunden, wobei nach Huxley und Simmons (1971) elastische Elemente der Querbrücke gespannt werden (s. Abb. 37). Der entscheidende Schritt im ganzen Zyklus scheint es zu sein, daß ATP vorübergehend so fest an Myosin gebunden wird, daß keine Bindung an Actin möglich ist, so daß die Querbrücke eine andere Konformation annehmen kann als die 45°-Stellung, die dem Myosinkopf durch Actin aufgezwungen wird.

Abb. 37 zeigt ein mögliches Modell des Querbrückenzyklus. Es wird versucht, die chemischen und mechanischen Prozesse einander zuzuordnen.

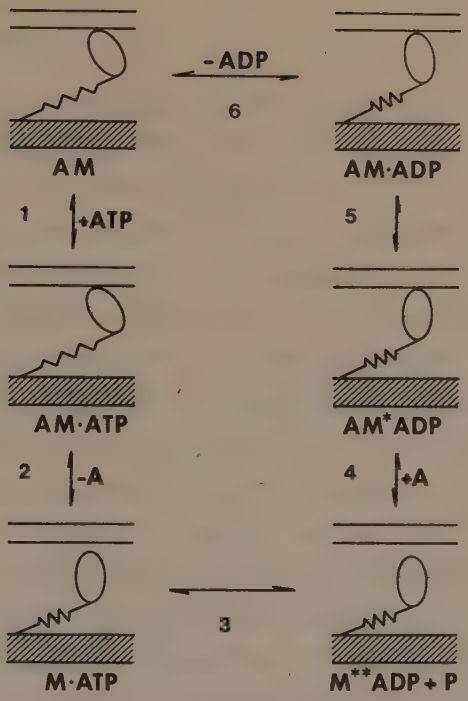


Abb. 37: Modell eines Querbrückenzyklus. Das Modell stützt sich im Wesentlichen auf die kinetischen Untersuchungen von Taylor und Mitarb. an Myosin und Actomyosin und von Trentham und Mitarb. an Myosin sowie auf die mechanischen Untersuchungen von Huxley und Simmons (1971). Aufgrund der eigenen Untersuchungen der $^{32}P_i$-Inkorporation in ATP wird die (reversible) Dissoziation des P_i schon vor dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt angenommen, um die aktivierende Wirkung des Actin auf die Einbau-Reaktion zu erklären.

Schritt (1): Bindung von ATP an Actomyosin; (2): Dissoziation von Actomyosin, Übergang der Querbrücke in die 90°-Stellung; (3): Spaltung von ATP durch Myosin,

Fortsetzg. der Legende zu Abb. 37

Bildung eines intermediären M**ADP-Komplexes; (4): Bindung von Actin, Übergang in einen weiteren M*ADP-Komplex, dessen Umwandlung in den einfachen M·ADP-Komplex in Schritt (5) geschwindigkeitsbestimmend ist und durch Actin beschleunigt wird. In (6) Dissoziation von ADP, Herstellung des Ausgangszustands. Unsicher ist im mechanischen Bereich die Festlegung des krafterzeugenden Schritts, des Übergangs in die 45°-Stellung der an Actin angehefteten Querbrücke. (Schraffiert: Myosinfilament; weiß: Actinfilament)

ZUSAMMENFASSUNG

Nach neueren Untersuchungen von Taylor und Mitarbeitern sowie von Trentham und Mitarbeitern verläuft die ATP-Spaltung im Muskel über verschiedene Teilschritte:

$E + ATP \longrightarrow E \cdot ATP \longrightarrow E \cdot ADP + P_i \longrightarrow E + ADP + P_i$,

wobei E (Enzym) in diesem (vereinfachten) Reaktions-Schema Myosin oder Aktomyosin sein kann. Für die Reversibilität der ATP-Spaltung spricht der von verschiedenen Autoren (Gillis und Maréchal; Mannherz; Ulbrich und Rüegg) erhobene Befund, daß radioaktiv markiertes anorganisches Phosphat durch das Aktomyosinsystem des Muskels in ATP inkorporiert werden kann. In dieser Arbeit wird die Frage zu beantworten versucht, ob die fragliche "Rückreaktion" mit dem Kontraktionsprozeß ebenso gekoppelt ist wie die ATP-Spaltungsreaktion, oder ob sie vielleicht umgekehrt gerade dann besonders groß ist, wenn die Muskelfaser mechanische Energie absorbiert, d. h., negative Arbeit leistet. In unseren Untersuchungen mit isolierten kontraktilen Systemen (glycerinextrahierten Muskelfasern) von Insektenflugmuskeln hat sich unter Verwendung von ATP als einziger Energiequelle gezeigt, daß nicht nur die ATP-Spaltungsreaktion, sondern auch die Phosphat-Inkorporation in ATP (Rückreaktion) mit dem Kontraktionsprozeß bzw. mit der mechanischen Leistung, nicht aber mit der Absorption von negativer Arbeit korreliert ist.

Die Koppelung der P_i-Inkorporation mit dem Kontraktionsprozeß spricht für die Bildung eines "energiereichen" Komplexes*

*aber nicht notwendigerweise für eine "energiereiche" Verbindung (~) im üblichen Sinn.

zwischen ADP, Myosin und Aktin im Verlauf der chemomechanischen Energietransformation, jedoch nicht für eine völlige Umkehr der chemomechanischen Prozesse.

In den beschriebenen Versuchen konnten die glycerinierten Fasern der Insektenmuskeln zur oszillatorischen Arbeitsleistung gezwungen werden, indem sie sinusförmig oder rechteckförmig gedehnt und entdehnt wurden. Durch Variieren der verschiedenen Parameter (Amplitude, Dehnungsdauer, Frequenz) rechteckförmiger oder sinusförmiger Dehnungszyklen wurde untersucht, in welcher Weise der Einbau von ^{32}P-Phosphat in ATP mechanisch gekoppelt ist. Dabei erfolgte der Nachweis des gebildeten ATP-(γ)-^{32}P durch Überführung des ATP in Gluc-6-P mittels Hexokinase und anschließende papierchromatographische Trennung des Gluc-6-P vom anorganischen Phosphat. Die Einbau-Reaktion ist im kontraktilen Proteinsystem lokalisiert. Wir haben uns davon überzeugt, daß die Reaktion nicht durch Inhibitoren der Mitochondrien oder des sarcoplasmatischen Reticulums gehemmt wird. Die Reaktion ist sehr stark abhängig von der ATP-Konzentration; ADP und P_i haben dagegen im untersuchten Konzentrationsbereich keinen oder nur geringen Einfluß. Von der Ca^{2+}-Konzentration und der Temperatur ist die Einbau-Reaktion in gleicher Weise abhängig wie die Aktomyosin-ATPase und die Kontraktion. Schließlich läßt sich eine Inkorporation von $^{32}P_i$ in ATP auch mit isoliertem Myosin in Anwesenheit, jedoch nicht in Abwesenheit von Aktin nachweisen (Ulbrich und Paulsen). Offenbar kommt die Inkorporation durch eine Rückreaktion im Sinne eines ATP-P_i-Austausches auf der Stufe eines Enzym-ADP-Intermediats zustande.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Abbott, R. H., and Chaplain, R. A. (1966): Preparation and Properties of the Contractile Element of Insect Fibrillar Muscle. J. Cell Sci. 1, 311

Abbott, R. H., and Leech, A. R. (1973): Persistence of Adenylate Kinase and Other Enzymes in Glycerol Extracted Muscle. Pflügers Arch. 344, 233

Abbott, R. H., and Mannherz, H. G. (1970): Activation by ADP and the Correlation between Tension and ATPase Activity in Insect Fibrillar Muscle. Pflügers Arch. 321, 223

Ashhurst, Doreen, E. (1969): The Effect of Glycerination on the Fibrillar Flight Muscles of Belostomatid Water-Bugs. Z. Zellforsch. 93, 36

Bagshaw, C. R., and Trentham, D. R. (1973): The Reversibility of Adenosine Triphosphate Cleavage by Myosin. Biochem. J. 133, 323

Bandurski, S., and Axelrod, B. (1951): The Chromatographic Identification of some Biologically Important Phosphate Esters. J. Biol. Chem. 193, 405

Bárány, M. (1967): ATPase Activity of Myosin Correlated with Speed of Muscle Shortening. J. Gen. Physiol. 50, 197

Barouch, W. W., and Moos, C. (1971): Effect of Temperature on Actin Activation of Heavy Meromyosin ATPase. Biochim. Biophys. Acta 234, 183

Barrington Leigh, J., Holmes, K. G., Mannherz, H. G., Rosenbaum, G., Eckstein, F., and Goody, R. (1972): Effects of ATP Analogs on the Low-Angle X-Ray Diffraction Pattern of Insect Flight Muscle. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 443

Bendall, J. R. (1969): Muscles, Molecules and Movement. An essay in the contraction of muscles. Heinemann Educational Books LTD., London

Bogucka, K., and Wojtczak, L. (1966): Effect of sodium azide on oxidation and phosphorylation processes in rat-liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 122, 381

Boyer, P. D. (1967): ^{18}O and related exchanges in enzymic formation and utilization of nucleoside triphosphates. Current Top. Bioenerg. 2, 99

Breull, W. (1971): Myofibrillar ATP-splitting in the elementary contractile cycle of an insect flight muscle. Experientia 27, 779

Breull, W., Steiger, G., and Rüegg, J. C. (1973): ATP splitting in relation to isometric tension-oscillation and crossbridge cycling of insect fibrillar muscle. J. Mechanochem. Cell Motil. 2, 91

Brocke, vom, H. H. (1966): The activating effects of calcium ions on the contractile systems of insect fibrillar flight muscle. Pflügers Arch. 290, 70

Bullard, B., Dabrowska, R., and Winkelman, L. (1973): The contractile and regulatory proteins of insect flight muscle. Biochem. J. 135, 277

Chaplain, R. A., and Tregear, R. T. (1966): The mass of myosin per crossbridge in insect fibrillar flight muscle. J. Mol. Biol. 21, 275

Dempsey, M. E., and Boyer, P. D. (1961): Catalysis of an inorganic phosphate-H_2O^{18} exchange by actomyosin and myosin. J. Biol. Chem. 236, PC 6

Dempsey, M. E., Boyer, P. D., and Benson., E. S. (1963): Characteristics of an orthophosphate oxygen exchange catalyzed by myosin, actomyosin, and muscle fibers. J. Biol. Chem. 238, 2708

Dixon, M., and Webb., E. C. (1964): Enzymes. 2nd Ed. Longmans, Green and Co Ltd. London

Ebashi, S. (1972): Calcium ions and muscle contraction. Nature 240, 217

Ebashi, S., and Endo, M. (1968): Calcium ion and muscle contraction. Progr. Biophys. Mol. Biol. 18, 123

Eisenberg, E., and Moos, C. (1968): Adenosine triphosphate activity of acto-heavy meromyosin. A kinetic analysis of actin activation. Biochem. 7, 1486

Elzinga, M., Collins, J. H., Kuehl, W. M., and Adelstein, R. S. (1973): Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2687

Finlayson, B., Lymn, R. W., and Taylor, E. W. (1969): Studies on the kinetics of formation and dissociation of the actomyosin complex. Biochem. 8, 811

Gillis, J. M., and Maréchal, G. (1969): Resynthesis of ATP in glycerinated fibres stretched during contraction. Proc. IIIrd Internat. Congr. Biophys., p. 271

Gillis, J. M., and Maréchal, G. (1971): Influence of tension on the incorporation of inorganic phosphate in glycerinated muscle fibres. J. Physiol. 214, 41P

Gillis, J. M., and Maréchal, G. (1974): The incorporation of radioactive phosphate into ATP in glycerinated fibres stretched or released during contraction. J. Mechanochem. Cell Motility 3, 55

Greaser, M. L., and Gergely, J. (1971): Reconstitution of troponin activity from three protein components. J. Biol. Chem. 246, 4226

Greaser, M. L., and Gergely, J. (1973): Purification and properties of the components from troponin. J. Biol. Chem. 248, 2125

Hartshorne, D. J., and Mueller, H. (1968): Fractionation of troponin into two distinct proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 647

Haselgrove, J. C. (1972): X-Ray evidence for a conformational change in the actin-containing filaments of vertebrate striated muscle. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 341

Hasselbach, W., and Makinose, M. (1962): ATP and active transport. Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 132

Hasselbach, W. und Makinose, M. (1963): Über den Mechanismus des Calciumtransportes durch die Membranen des Sarkoplasmatischen Reticulums. Biochem. Zs. 339, 94

Hayashi, Y., and Tonomura, Y. (1970): On the active site of myosin A-adenosine triphosphatase. X. Functions of two subfragments, S-1, of the myosin molecule. J. Biochem. 68, 665

Head, J. F., and Perry, S. V. (1974): The interaction of the calcium-binding protein (troponin C) with bivalent cations and the inhibitory protein (troponin I). Biochem. J. 137, 145

Hill, A. V., and Howarth, J. V. (1959): The reversal of chemical reactions in contracting muscle during an applied stretch. Proc. R. Soc. B, 151, 169

Hotta, K., and Fujita, Y. (1971): On the intermediate complex of actomyosin ATPase. Physiol. Chem. & Physics 3, 196

Huxley, A. F. (1957): Muscle structure and theories of contraction. Progr. Biophys. biophys. Chem. 7, 255

Huxley, A. F., and Niedergerke, R. (1954): Interference microscopy of living muscle fibres. Nature 173, 971

Huxley, A. F., and Simmons, R. M. (1971): Proposed mechanism of force generation in striated muscle. Nature 233, 533

Huxley, H. E. (1957): The double array of filaments in cross-striated muscle. J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 631

Huxley, H. E. (1959): The mechanism of muscular contraction. Science 164, 1356

Huxley, H. E. (1971): The structural basis of muscular contraction. Proc. Roy. Soc. Lond. B 178, 131

Huxley, H. E., and Hanson, J. (1954): Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their interpretation. Nature 173, 973

Huxley, H. E., Brown, W., and Holmes, K. C. (1965): Constancy of axial spacings in frog sartorius muscle during contraction. Nature 206, 1358

Ikezawa, H., Ikezawa, K., Tonomura, Y., and Morales, M. F. (1971): An attempt to detect phosphorylated myosin by ADP-ATP exchange. J. Biochem. 69, 901

Imamura, K., Kanazawa, T., Tada, M., and Tonomura, Y. (1965): The pre-steady state of the myosin-adenosine triphosphate system. III. Properties of the intermediate. J. Biochem. 57, 627

Inoue, A. (1973): Does actomyosin catalyze the ATP-P_i-exchange reaction? J. Biochem., 73, 1311

Jewell, B. R., and Rüegg, J. C. (1966): Oscillatory contraction of insect fibrillar muscle after glycerol extraction. Proc. R. Soc. B 164, 428

Kitagawa, S., and Tonomura, Y. (1962): Possibility of phosphorylation of myosin as the initial phase of the myosin-adenosinetriphosphatase reaction. Biochim. Biophys. Acta 57, 416

Kominz, D. R. (1970): Studies of adenosine triphosphatase activity and turbidity in myofibril and actomosin suspensions. Biochem. 9, 1792

Korman, E. F., and McLick, J. (1973): Stereochemical reaction mechanism formulations for enzyme-catalyzed pyrophosphate hydrolysis, ATP hydrolysis, and ATP synthesis. Bioorganic Chem. 2, 179

Koshland, D. E., Jr., Budenstein, Z., and Kowalski, A. (1954): Mechanism of hydrolysis of adenosinetriphosphate catalyzed by purified muscle proteins. J. Biol. Chem. 211, 279

Kuhn, H. J. (1973): Transformation of chemical into mechanical energy by glycerol-extracted fibres of insect flight muscles in the absence of nucleosidetriphosphate-hydrolysis. Experientia 29, 1086

Kuhn, H. J., Schröder, H., and Rüegg., J. C. (1972): Force Generation in glycerinated insect-flight muscles without ATP. Experientia 28, 510

Lardy, H. A., Johnson, D., and McMurray, W. C. (1958): Antibiotics as tools for metabolic studies. I. A survey of toxic antibiotics in respiratory, phosphorylative and glycolytic systems. Arch. Biochem. Biophys. 78, 587

Levy, H. M., and Koshland, D. E., Jr., (1959): Mechanism of hydrolysis of adenosinetriphosphate by muscle proteins and its relation to muscular contraction. J. Biol. Chem. 234, 1102

Levy, H. M., Sharon, N., and Koshland, D. E., Jr. (1959): Purified muscle proteins and the walking rate of ants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 45, 785

Levy, H. M., Sharon, N., Lindemann, E., and Koshland, D. E., Jr. (1960): Properties of the active site in myosin hydrolysis of adenosine triphosphate as indicated by the O^{18}-exchange reaction. J. Biol. Chem. 235, 2628

Löw, H., Siekevitz, P., Ernster, L., and Lindberg, O. (1958): Studies on the relation of adenosinetriphosphate - inorganic phosphate exchange reaction of mitochondria to oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 29, 392

Lowey, S., and Luck., S. M. (1969): Equilibrium binding of adenosine diphosphate to myosin. Biochem. 8, 3195

Lowey, S., Slayter, H. S., Weeds, A. G., and Baker, H. (1969): Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. J. Mol. Biol. 42, 1

Lymn, R. W., and Taylor, E. W. (1970): Transient state phosphate production in the hydrolysis of nucleoside triphosphates by myosin. Biochem. 9 2975

Lymn, R. W., and Taylor, E. W. (1971): Mechanism of Adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. Biochem. 10, 4617

Makinose, M. (1966): Die Nucleosidtriphosphat-Nucleosiddiphosphat-Transphosphorylase-Aktivität der Vesikel des sarcoplasmatischen Reticulums. Biochem. Zs. 345, 80

Makinose, M. (1971): Calcium efflux dependent formation of ATP from ADP and orthophosphate by the membranes of the sarcoplasmic vesicles. Febs Letters 12, 269

Makinose, M., and Hasselbach, W. (1971): ATP Synthesis by reverse of the sarcoplasmic calcium pump. Febs Letters 12, 271

Mannherz, H. G. (1968): ATP-Spaltung und ATP-Diffusion in oscillierenden Muskelfasern. Pflügers Arch. 303, 230

Mannherz, H. G. (1970): On the reversibility of the biochemical reactions of muscular contraction during the absorption of negative work. Febs Letters 10, 233

Margossian, S. S., and Lowey, S. (1973): Substructure of the myosin molecule. III. Preparation of single-headed derivatives of myosin. J. Mol. Biol. 74, 301

Marsh, B. B. (1959): The estimation of inorganic phosphate in the presence of adenosine triphosphate. Biochim. Biophys. Acta 32, 357

Marston, S. (1973): The nucleotide complexes of myosin in glycerol-extracted muscle fibers. Biochim. Biophys. Acta 305, 397

Maruyama, K., Pringle, J. W. S., and Tregear, R. T. (1968): The calcium sensitivity of ATPase activity of myofibrils and actomyosins from insect flight and leg muscles. Proc. Roy. Soc. B 169, 229

Metzner, H. (1971): Energetik der Zelle. (in "Die Zelle, Struktur und Funktion"; WVG, Stuttgart)

Meyerhof, O. (1930): Die chemischen Vorgänge im Muskel und ihr Zusammenhang mit Arbeitsleistung und Wärmebildung. Verl. J. Springer, Berlin

Moore, P. B., Huxley, H. E., and De Rosier, D. J. (1970): Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments. J. Mol. Biol. 50, 279

Morita, F. (1967): Interaction of heavy meromyosin with substrate. I. Difference in ultraviolet absorption spectrum between heavy meromyosin and its Michaelis-Menten Complex. J. Biol. Chem. 242, 4501

Nanninga, L. B. (1962): On the inhibition of myosin-ATPase by adenosine diphosphate. Arch. Biochem. Biophys. 96, 51

Naylor, W. G., and Merrillees, N. C. R. (1964): Some observations on the fine structure and metabolic activity of normal and glycerinated ventricular muscle of toad. J. Cell Biol. 22, 535

Novikoff, A. B., Hecht, L., Podber, E., and Ryan, J. (1952): Phosphatases of rat liver. I. The dephosphorylation of adenosinetriphosphate. J. Biol. Chem. 194, 153

Parry, D. A. D., and Squire, J. M. (1973): Structural role of tropomyosin in muscle regulation: analysis of the X-ray diffraction patterns from relaxed and contracting muscles. J. Mol. Biol. 75, 33

Paulsen, G.: in Vorbereitung

Perry, S. V. (1967): The structure and interactions of myosin. Progr. Biophys. Mol. Biol. 17, 325

Portzehl, H., Caldwell, P. C., and Rüegg, J. C. (1964): The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab Maia squinado on the internal concentration of free calcium ions. Biochim. Biophys. Acta 79, 581

Portzehl, H., Zaoralek, P., and Gaudin, J. (1969): Association and dissociation of the thick and thin filaments within myofibrils in conditions of "contraction" and "relaxation". Biochim. Biophys. Acta 189, 429

Pringle, J. W. S. (1967): The contractile mechanism of insect fibrillar muscle. Progr. Biophys. Mol. Biol. 17, 1

Pullman, B., and Pullman, A. (1967): Quantum biochemistry. In M. Florkin and E. H. Stotz: Comprehensive Biochemistry, Vol. 22, 1 - 60, 1967

Pybus, J., and Tregear, R. (1972): Estimates of force and time of actomyosin interaction in an active muscle and of the number interacting at any one time. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 655

Reedy, M. K., Holmes, K. C., and Tregear, R. T. (1965): Induced changes in orientation of the cross-bridges of glycerinated insect flight muscle. Nature 207, 1276

Robertson. H. E., and Boyer, P. D. (1955): The effect of azide on phosphorylation accompanying electron transport and glycolysis. J. Biol. Chem. 214, 295

Rüegg, J. C. (1972): Die Funktionsweise myogen oszillierender Insektenmuskeln. Verh. Dtsch. Zool. Ges., 65. Jvers., S. 285, G. Fischer Verl.

Rüegg, J. C., Schädler, M., Steiger, G. J., and Müller, G. (1971): Effects of inorganic phosphate on the contractile mechanism. Pflügers Arch. 325, 359

Rüegg, J. C., Steiger, G. J., and Schädler, M. (1970): Mechanical activation of the contractile system in skeletal muscle. Pflügers Arch. 319, 139

Rüegg, J. C., and Stumpf, H. (1969): Activation of the myofibrillar ATPase activity by extension of glycerol-extracted insect fibrillar muscle. Pflügers Arch. 305, 34

Rüegg, J. C., and Tregear, R. T. (1966): Mechanical factors affecting the ATPase activity of glycerol-extracted insect fibrillar flight muscle. Proc. Roy. Soc., B, 165, 497

Sacktor, B. (1953): Investigations on the mitochondria of the house fly, Musca domestica L. I. Adenosinetriphosphatases. J. Gen. Physiol. 36, 371

Sartorelli, L. Fromm, H. J., Benson, R. W., and Boyer, P. D. (1966): Direct and ^{18}O-exchange measurements relevant to possible activated or phosphorylated states of myosin. Biochem. 5, 2877

Schädler, M. (1967): Proportionale Aktivierung von ATPase-Aktivität und Kontraktionsspannung durch Calciumionen in isolierten contractilen Strukturen verschiedener Muskelarten. Pflügers Arch. 296, 70

Schädler, M., Steiger, G., and Rüegg, J. C. (1969): Tension transients in glycerol-extracted fibres of insect fibrillar muscle (Lethocerus maximus). Experientia 25, 942

Schädler, M., Steiger, G. J., and Rüegg, J. C. (1971): Mechanical activation and isometric oscillation in insect fibrillar muscle. Pflügers Arch. 330, 217

Schaub, M. C., and Perry, S. V. (1969): The relaxing protein system of striated muscle. Biochem. J. 115, 993

Schliselfeld, L. H., and Bárány, M. (1968): The binding of adenosine triphosphate to myosin. Biochem. 7, 3206

Seidel, J. C., and Gergely, J. (1971): The conformation of myosin during the steady state of ATP hydrolysis: studies with myosin spin labeled at the S_1 thiol groups. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 826

Seidel, J. C., and Gergely, J. (1973): Electron spin resonance of myosin spin labeled at the S_1 thiol groups during hydrolysis of adenosine triphosphate. Arch. Biochem. Biophys. 158, 853

Siekevitz, P., Löw, H., Ernster, L., and Lindberg, O. (1958): On a possible mechanism of the adenosinetriphosphatase of liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 29, 378

Smith, D. S. (1961): The structure of insect fibrillar flight muscle. A study made with special reference to the membrane systems of the fibre. J. Biochem. Cytol. 10, 123

Smith, D. S. (1966): The organization and function of the sarcoplasmic reticulum and T-system of muscle cells. Progr. Biophys. Mol. Biol. 16, 107

Spudich, J. A., Huxley, H. E., and Finch, J. T. (1972): Regulation of skeletal muscle contraction. II. Structural studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin. J. Mol. Biol. 72, 619

Steiger, G. (1969): Wirkungsweise, Energetik und Nutzeffekt der isolierten kontraktilen Maschine fibrillärer Insektenflugmuskeln. Dissertation, TH Karsruhe

Steiger, G. J. (1971): Stretch activation and myogenic oscillation of isolated contractile structures of heart muscle. Pflügers Arch. 330, 347

Steiger, G. J., and Rüegg, J. C. (1969): Energetics and "efficiency" in the contractile machinery of an insect fibrillar muscle at various frequencies of oscillation. Pflügers Arch. 307, 1

Swanson, J. R., and Yount, R. G. (1966): The properties of heavy meromyosin and myosin catalyzed "medium" and "intermediate" ^{18}O-phosphate exchange. Biochem. Zs. 345, 395

Swanson, M. A. (1956): Studies on the non-oxidative exchange between inorganic phosphate and ATP, as catalyzed by intact mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 29, 85

Szent-Györgyi, A. (1949): Free energy relations and contraction of actomyosin. Biol. Bull. 96, 140

Tanaka, H. (1972): The helix content of tropomyosin and the interaction between tropomyosin and F-actin under various conditions. Biochim. Biophys. Acta 278, 556

Taylor, E. W., Lymn, R. W., and Moll, G. (1970): Myosin-product complex and its effect on the steady-state rate of nucleoside triphosphate hydrolysis. Biochem. 9, 2984

Thorson, J., and White, D. C. S. (1969): Distributed representations for actin-myosin interaction in the oscillatory contraction of muscle. Biophys. J. 9, 360

Tonomura, Y., and Kanazawa, T. (1965): Formation of a reactive myosin-phosphate complex as a key reaction in muscle contraction. J. Biol. Chem. 240, PC4110

Tonomura, Y., Kitagawa, S., and Yoshimura, J. (1962): The initial phase of myosin A-adenosinetriphosphatase and the possible phosphorylation of myosin A. J. Biol. Chem. 237, 3660

Trentham, D. R., Bardsley, R. G., and Eccleston, J. F., and Weeds, A. G. (1972): Elementary process of the magnesium-ion-dependent adenosine triphosphatase activity of heavy meromyosin. Biochem. J. 126, 635

Ulbrecht, G. und Ulbrecht, M. (1957): Phosphat-Austausch zwischen ATP und AD^{32}P durch hochgereinigte Aktomyosin-Präparate und gewaschene Muskelfibrillen. (I. Mitteilung) Biochim. Biophys. Acta 25, 100

Ulbrecht, M. (1962): Beruht der Phosphat-Austausch zwischen ATP und AD^{32}P in gereinigten Fibrillen und Aktomyosin-Präparaten auf einer Verunreinigung durch Muskel-Grana? Biochim. Biophys. Acta 57, 438

Ulbrich, M. und Paulsen, G. (1973): Bildung eines energie-reichen Aktomyosin-ADP-Komplexes in extrahierten Muskel-fasern und isolierten Proteinen. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 232

Ulbrich, M., and Rüegg, J. C. (1971): Stretch induced formation of ATP-^{32}P in glycerinated fibres of insect flight muscle. Experientia 27, 45

Vigers, G. A., and Ziegler, F. D. (1968): Azide inhibition of mitochondrial ATPase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 83

Weber, A. (1959): On the role of calcium in the activity of adenosine-5'-triphosphate hydrolysis by actomyosin. J. Biol. Chem. 234, 2764

Weber, A. und Hasselbach, W. (1954): Die Erhöhung der Rate der ATP-Spaltung durch Myosin- und Actomyosin-Gele bei Beginn der Spaltung. Biochim. Biophys. Acta 15, 237

Werber, M. M., Szent-Györgyi, A. G., and Fasman, G. D. (1972): Fluorescence Studies on heavy meromyosin-substrate interaction. Biochem. 11, 2872

Wilson, J. A., Elliott, P. R., Guthe, K. F., and Shappirio, D. G. (1959): Oxygen uptake of glycerol-extracted muscle fibres. Nature, Lond. 184, 1947

Wolcott, R. G., and Boyer, P. D. (1974): The reversal of the myosin and actomyosin ATPase reactions and the free energy of ATP binding to myosin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 709

Young, J. H., McLick, J., and Korman, E. F. (1974): Pseudorotation mechanism of ATP hydrolysis in muscle contraction. Nature 259, 474

Young, M. (1967): Studies on the structural basis of the interaction of myosin and actin. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 58, 2393

Zieger, W. W. (1969): Magnesium und die Hemmung der Actin-Myosin-Interaktion in isolierten contractilen Strukturen der fibrillären Insektenmuskeln. Pflügers Arch. 311, 256

Abkürzungen:
A = Aktin, AM = Aktomyosin, ADP = Adenosindiphosphat, ATP = Adenosintriphosphat, DNP = Dinitrophenol, EGTA = Äthylenglykol-bis-(2-aminoäthyläther)N,N'-tetraessigsäure, Gluc-6-P = Glucose-6-Phosphat, HMM = Heavy Meromyosin, LMM = Light Meromyosin, L_o = Ausgangslänge der Muskelfasern (s. S. 32), M = Myosin, P_i = anorganisches Phosphat

Danken möchte ich:

Prof. Dr. J. C. Rüegg für die Anregung zu dieser Arbeit und nicht nachlassendes Interesse;

Dr. H. G. Mannherz für die Einführung in die Methodik;

meinen Kollegen Dr. H. Kuhn, Dr. G. Paulsen und Dr. G. Steiger für nützliche und anregende Diskussionen;

Frau U. Herzig und Frau J. Zwoycyk für ATPase-Bestimmungen.

Lebenslauf

Geboren am 3. 7. 1944 in Bayreuth als Tochter des Physikers Dr. Raimund Ulbrich und seiner Ehefrau Ilse, geb. Styra. Besuch der Volksschule von 1950 bis 1954 in Schwarzenfeld/Opf.. Abitur 1963 am altsprachlichen Ludwig-Georgs-Gymnasium in Darmstadt. Vom Sommersemester 1963 an Studium der Biologie und Chemie an der Technischen Hochschule Darmstadt. Abschluß im Dezember 1969 mit Diplom nach Anfertigung einer Diplomarbeit bei Prof. H. Ziegler. Seit 1970 Arbeit an einer Dissertation im Institut für Zellphysiologie der Ruhr-Universität Bochum unter Leitung von Prof. Dr. J. C. Rüegg. Von Nov. 1970 bis Okt. 1973 Anstellung als Verw. einer wissenschaftl. Assistentenstelle. Seit Nov. 1973 im II. Physiologischen Institut der Universität Heidelberg.

Margret Ulbrich

Mielke Werbung und Verlag D-6901 Neckarsteinach Postfach 51